F 1330
66

studii şi cercetări de

biochimie

1

TOMUL 20

1977

IANUARIE—IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 20, nr. 1, p. 1—120, 1977, Bucureşti

SCBIAS — 20, (1), 1—120 (1977)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei R. S. România ; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R. S. România ; M. MEZINCESCU ; I. VASILESCU ; TR. RĂDULESCU ; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de două ori pe an

Prețul unui abonament anual este de 40 lei

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona prin ILEXIM Departamentul EXPORT — IMPORT CARTE, Departamentul EXPORT—IMPORT PRESĂ (pentru reviste) —str. 13 Decembrie nr. 3, P.O.Box 136 — 137 telex 11226 — București, România.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie" 7000 București, 2, POB 1002.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

71021 București, Calea Victoriei 125, tel. 50 76 80

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA
DOKUMENTÁCIÓS OSZTÁLYA
1883

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 20, nr. 1 1977

IANUARIE – IUNIE

SUMAR

SIMONA CEAUŞESCU, ANGELA MIHĂESCU, VIOLETA PETROVAN, V. PUŞCĂ-HOREANGĂ, Determinarea unor componente în frunzele de ricin folosite ca hrană pentru *Philosamia ricini* 5

CEZARINA CUCU, Studiu metodologic comparativ pentru dozarea enzimatică a ureei serice 9

ELENA GANEA, Hidroxiprolina urinară nedializabilă – un nou test pentru depistarea maladiilor tiroidiene 15

ELENA GANEA, ELENA DINULESCU, Studiul comparativ al modificărilor hidroxiprolinei, acidului neuraminic şi tirozinei în investigarea funcţiei tiroidiene 19

STELA GHEŢIE, POLINA PIRCU, AURORA POPESCU, Activitatea unor oxidoreductaze şi hidrolaze din gingia umană normală şi patologică . . . 25

ECATERINA ILICA, ZINA MOLDOVEANU, CECILIA MOTAŞ, Activităţile proteolitice ale proteinelor solubile extrase din nămolurile active normale şi intoxicate cu *p*-nitro-anilină 31

JABBAR-S-AHMED, Specificitatea de specie a legării IgG de receptorii Fc ai limfocitelor şi macrofagelor. II. Legarea IgG monomeră de limfocite şi macrofage omologe şi eterologe 39

CORNELIA MIHAI, MIHAIL ŞERBAN, Aspecte ale transportului activ mitocondrial. 45

ZINA MOLDOVEANU, ECATERINA ILICA, SANDA RĂDULESCU, Metodă de extracţie a proteinelor solubile din nămolurile active 51

I. MORARU, A. C. BANCU, A. SULICĂ, LUCREŢIA CIUCĂ, Izolarea limfocitelor umane prin centrifugare în gradient de polivinilpirolidonă-odiston 55

GABRIELA MOŢA, Izolarea subclasei IgA_1 din colostru uman 59

G. NEAMŢU, GH. SĂLĂJAN, T. LÁSZLO, C. BILAUS, K. L. SIMPSON, Cercetări privind utilizarea pigmenţilor carotenoidici. III. Efectul uleiului din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* asupra pigmentaţiei gălbenuşului de ou 63

DOINA POPOV, OFELIA GOZIA, MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL, M. ŞERBAN, Cercetări comparative asupra proteinelor şi unor enzime din oocite la unele specii de peşti teleostei 71

H. D. SCHELL, LORA SCOLNIC, MIOARA CÂRSTEANU, Imobilizarea aldolazei prin legare covalentă de CM-agaroză legată încrucişat şi proprietăţile fizico-chimice şi catalitice ale conjugatului enzimatic insolubil obţinut 77

LORA SCOLNIC, Influența ionului de potasiu și rubidiu asupra activității aldolazei din mușchiul gastrocnemian de broască 83

S. VASU, Enzime pectolitice din *Aspergillus niger*. V. Producerea enzimelor pectolitice în prezența substanțelor pectice 87

REFERAT GENERAL

ELENA GANEA, GRUIA IONESCU, Structura și rolul componentului glucidic din imunoglobuline 95

RECENZII 109

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 20, nr. 1 1977

IANUARIE—IUNIE

CONTENTS

SIMONA CEAUŞESCU, ANGELA MIHĂESCU, VIOLETA PETROVAN, V. PUŞCĂ-HOREANCĂ, La détermination de quelques, composantes dans les feuilles du ricin utilisées comme nourriture pour *Philosamia ricini* 5

CEZARINA CUCU, L'étude méthodologique comparative, pour la détermination du niveau de l'urée sérique 9

ELENA GANEA, Urinary nondialysable hydroxyproline — a new test for thyroid diseases detecting 15

ELENA GANEA, ELENA DINULESCU, Comparative study of the hydroxiproline, neuraminic acid and thyrosine modifications in the investigation of thyroid function 19

STELA GHEŢIE, POLINA PIRCU, AURORA POPESCU, The activity of some oxido-reductases and hydrolases in human normal and pathological gingiva 25

ECATERINA ILICA, ZINA MOLDOVEANU, CECILIA MOTAŞ, Proteolitic activities of soluble proteins extracted from normal and *p*-nitro-aniline intoxicated active sludges 31

JABBAR-S-AHMED, Species specificity of IgG binding to Fc receptors on lymphocytes and macrophages. II. Monomer IgG binding to homologous and heterologous lymphocytes and macrophages 39

CORNELIA MIHAI, MIHAIL ŞERBAN, Aspects of the active mitocondrial transport 45

ZINA MOLDOVEANU, ECATERINA ILICA, SANDA RĂDULESCU, A method of soluble proteins extraction from active sludges 51

I. MORARU, A. C. BANCU, A. SULICĂ, LUCREŢIA CIUCĂ, Purification of human lymphocytes by gradient centrifugation on a polyvinylpyrrholidon-Odiston mixture 55

GABRIELA MOŢA, IgA_1 sublcass isolation from human colostrum 59

G. NEAMŢU, GH. SĂLĂJAN, T. LÁSZLO, C. BILAUS, K. L. SIMPSON, Researches on the utilization of carotenoid pigments. III. The effect of the *Hyppophaë rhamnoides* fruit oil on the pigmentation of egg yolk 63

DOINA POPOV, OFELIA GOZIA, MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL, M. ŞERBAN, Comparative studies on proteins and enzymes from the oocytes of several teleostei species 71

H. D. SCHELL, LORA SCOLNIC, MIOARA CÂRSTEANU, Immobilizierung der Aldolase durch kovalente bindung an Vernetzte CM-Agarose und die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Erhaltenen Unlöslichen Enzymkonjugates 77

St. cerc. biochim., tomul 20, 1, p. 1—120, Bucureşti, 1977

LORA SCOLNIC, The effect of potassium and rubidium ions upon aldolase activity in frog gastrocnemius muscle 83

S. VASU, Pectolytic enzymes of *Aspergilus niger*. V. The production of pectolytic enzymes in the presence of pectic substances 87

GENERAL REVIEW

ELENA GANEA, GRUIA IONESCU, Structure and role of carbohydrate component in immunoglobulins 95

REVIEW 109

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 5 – 8 (1977)

DETERMINAREA UNOR COMPONENTE ÎN FRUNZELE DE RICIN FOLOSITE CA HRANĂ PENTRU *PHILOSAMIA RICINI*

SIMONA CEAUŞESCU, ANGELA MIHĂESCU, VIOLETA PETROVAN, V. PUŞCĂ-HOREANGĂ

Rezumat. – Larvele de *Philosamia Ricini* au fost hrănite în ultimele trei vîrste pe loturi cu frunze de *Ricinus communis*, recoltate de la cele trei etaje ale plantelor. S-au determinat ionii de Ca^{2+} şi K^{+}, lipidele, glucidele reducătoare şi celuloza brută în categoriile de frunze şi în reziduurile digestiei larvelor pe loturi, stabilindu-se valoarea nutritivă mai bună a frunzelor tinere şi producţia sporită de mătase ca urmare a consumării lor.

Frunzele de *Ricinus communis* constituie hrana larvelor de *Philosamia ricini*, care este crescută în ţara noastră alături de specia de bază *Bombyx mori*, pentru asigurarea cerinţelor de mătase naturală ale economiei naţionale.

Cercetările întreprinse pe plan mondial au stabilit conţinutul diferit în glucide şi ioni al varietăţilor de *Ricinus communis* (2), cerinţele larvelor de *Philosamia ricini* în glucide (4), variaţia activităţii lipazice în cursul metamorfozei (5), metabolismul glucidelor şi lipidelor înainte şi după îngogoşare (3).

Prezenta lucrare s-a efectuat în scopul precizării conţinutului în ioni de Ca^{2+} şi K^{+}, lipide, glucide reducătoare şi celuloză brută al frunzelor de ricin recoltate de la diferite etaje ale plantelor şi a gradului de asimilare a acestor componente în procesul hrănirii larvelor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Creşterea experimentală de larve s-a desfăşurat în vara anului 1975, la Staţiunea de cercetări pentru Sericicultură Bucureşti, prin alcătuirea a 4 loturi omogene de cîte 100 larve din rasa *Pimazam nr. 58* originară din R. P. D. Coreeană.

Cele 4 loturi au fost hrănite separat în ultimele trei vîrste larvare cu cîte o categorie de frunze de *Ricinus communis*, var. sanguineus, recoltate de la cele trei etaje ale plantelor: etajul inferior (frunze mature), etajul mijlociu, etajul superior (frunze tinere), cel de-al IV-lea lot primind un amestec de frunze de pe întreaga plantă (lotul martor).

Analiza biochimică a frunzelor şi a egestei larvelor s-a efectuat în laboratorul de biochimie al facultăţii de biologie Bucureşti, pe probe medii de cîte trei grame substanţă uscată, prin metodele: flamfotometrică pentru ionii de Ca^{2+} şi K^{+}, Somogy – Nelson pentru glucidele reducătoare, Soxhlet pentru lipide şi Henneberg – Stohmann pentru celuloza brută (1).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

1.a. *Compoziţia chimică a frunzelor de Ricinus communis.* Determinările efectuate asupra frunzelor recoltate în luna iulie de la cele trei etaje ale plantelor arată următoarele (tabelul 1):

Tabelul 1

Compoziția chimică a frunzelor în funcție de etaje

Variantele (etajele plantelor)	Ca^{2+} mg %	K^+ mg %	Lipide g%	glucide red. g%	Celuloza brută g%
V.1-inferior	1,15	1,05	3,00	3,10	36,15
V.2-mijlociu	1,05	1,20	2,50	4,06	27,62
V.3-superior	1,45	1,10	1,78	4,03	30,16
V.4-martor	1,05	1,10	2,44	4,00	33,47

— conținutul în ioni de Ca^{2+} este mai bine exprimat în frunzele tinere și mature, cel de ioni de K^+ se remarcă relativ mai slab în frunzele mature comparativ cu cele din etajul mijlociu și superior;

— lipidele se găsesc în proporție mai mare în frunzele mature și mai puțin în cele tinere, în timp ce glucidele reducătoare sînt prezente mai ales în frunzele mijlocii și tinere;

— celuloza brută se află în cantitate maximă în frunzele mature, minimă în frunzele din etajul mijlociu și medie în cele tinere.

În amestecul de frunze de pe toată planta, valorile găsite la toate substanțele au fost intermediare față de datele pe etaje.

1.b. *Compoziția chimică a egestei larvelor.* Din analiza egestei larvelor în vîrstele IV și V (vîrsta a III-a fiind considerată perioadă preexperimentală de obișnuire a larvelor cu frunzele administrate separat pe loturi) s-au obținut următoarele date (tabelul 2):

Tabelul 2

Compoziția chimică a egestei larvelor pe variante și vîrste

Variante	Ca^{2+} mg%		K^+ mg%		Lipide g%		Glucide red. g%		Celuloză br. g%	
	v.IV	v.V	v.IV	v.V	v.IV	v.V	v. IV	v.V	v.IV	v.V
V.1	0,50	1,00	1,03	0,60	1,60	1,80	3,00	2,15	20,73	27,25
V.2	0,67	0,67	1,10	0,65	1,70	1,95	4,00	3,25	23,22	27,40
V.3	0,50	0,50	1,10	0,05	1,65	1,15	2,35	2,25	22,75	26,76
V.4	0,55	0,57	1,00	0,80	1,65	1,70	3,35	2,70	22,25	27,03

În general, substanțele cercetate au fost eliminate diferit în cele două vîrste: Ca^{2+} mai ales în vîrsta a V-a, K^+ în vîrsta a IV-a, lipidele în vîrsta a V-a, glucidele reducătoare în vîrsta a IV-a, celuloza în vîrsta V-a.

2. *Digestibilitatea componentelor din frunze.* Pe baza raportului $\frac{\text{Ingesta} - \text{Egesta}}{\text{Ingesta}} \times 100$, s-a constatat asimilarea diferită a compo-

nentelor menţionate, în ultimele două vîrste larvare, în raport cu etajele plantelor de la care s-au recoltat frunzele :

— ionii de calciu au fost digeraţi mai activ în vîrsta a IV-a, 56,5% în cazul frunzelor mature, 36% la frunzele din etajul mijlociu, 65,5% la cele tinere, 47,6% la lotul martor, în vîrsta a V-a gradul de asimilare fiind mai redus la frunzele mature (13%), la cele din etajul mijlociu (36%), identic celui din vîrsta a IV-a la frunzele tinere (65,5%) şi intermediar la amestecul de frunze (45,7%);

— ionii de potasiu au fost mai puţin digeraţi în vîrsta a IV-a, 1,9% la frunzele mature, 8,3% la frunzele din etajul mijlociu, 10% la frunzele tinere şi la martor, digestibilitatea lor crescînd în vîrsta a V-a la 43% la frunzele mature, 46% la frunzele din etajul mijlociu, 18% la cele tinere şi 27% la amestecul de frunze ;

— lipidele au fost digerate mai activ în vîrsta a IV-a, 46,7% la frunzele mature, 28% la cele din etajul mijlociu, foarte slab la frunzele tinere (7,3%) şi intermediar la martor (32,6%), digestibilitatea în vîrsta a V-a înregistrînd 40% la frunzele mature, 22% la cele din etajul mijlociu, 35% la frunzele tinere şi 30% la martor ;

— glucidele reducătoare au fost digerate în general mai slab în vîrsta a IV-a, 3,2% la frunzele mature, 1,5% la cele din etajul mijlociu, mai activ 41,7% la frunzele tinere şi intermediar, 16% la martor ; în vîrsta a V-a, digestibilitatea glucidelor a crescut la 30,6% la frunzele mature, 20% la cele din etajul mijlociu, 44% la frunzele tinere şi 33% la amestecul de frunze ;

— celuloza brută a fost digerată mai bine în vîrsta a IV-a de creştere intensă a larvelor, 42,6% la frunzele mature, 16% la cele din etajul mijlociu, 24,6% la cele tinere, 33,5% la martor, faţă de valorile găsite în vîrsta a V-a, 24,6% la frunzele din etajul inferior, numai 0,8% la cele din etajul mijlociu, 11% la cele tinere şi 19% la martor.

Este de menţionat că viabilitatea larvelor a fost de 98% la loturile ce au consumat frunze mature şi din etajul mijlociu, 99% la martor şi 100% la lotul hrănit cu frunze tinere, la acest ultim lot înregistrîndu-se şi o producţie mai bună de mătase.

CONCLUZII

Din datele privind valoarea hrănitoare a frunzelor de *Ricinus communis* recoltate separat de pe cele trei etaje ale plantelor şi administrate larvelor de *Philosamia ricini* în ultimele vîrste pe loturi, se desprind următoarele concluzii :

1. Frunzele tinere din etajul superior se disting printr-un conţinut mai bogat în ioni de Ca^{2+}, relativ mare în ioni de K^+ şi în glucide reducătoare, mai sărac în lipide şi intermediar în celuloză, în raport cu frunzele din etajul inferior şi mijlociu al plantelor.

2. Digestibilitatea componentelor din frunze a fost diferită pe parcursul vîrstelor larvare : ionii de Ca^{2+} au fost asimilaţi mai activ în vîrsta a IV-a (cei din frunzele tinere la un nivel superior în ambele vîrste), ionii de K^+ mai mult în vîrsta a V-a (în special cei din frunzele mature şi din etajul mijlociu), lipidele relativ mai bine în vîrsta a IV-a (în frunzele

tinere mai mult în vîrsta a V-a), glucidele reducătoare mai pronunțat în vîrsta a V-a (în frunzele tinere în ambele vîrste), celuloza brută mai puțin asimilată în vîrsta a V-a față de vîrsta a IV-a.

3. Componentele cercetate în frunzele tinere au avut o digestibilitate sporită în ultimele vîrste larvare, cu excepția celulozei, cu influență pozitivă asupra viabilității larvelor și producției de mătase.

Prezentat la redacție 25 noiembrie 1976

Universitatea din București
Facultatea de biologie
Catedra de ecologie, fiziologie animală și biochimie

LA DÉTERMINATION DE QUELQUES COMPOSANTS DANS LES FEUILLES DE RICIN UTILISÉES COMME NOURRITURE POUR *PHILOSAMIA RICINI*

(RÉSUMÉ)

Les larves de *Philosamia ricini* ont été nourries pendant les derniers 3 âges par des lots avec des feuilles de *Ricinus communis*, provenant des trois étages des plantes. On a déterminé les ions Ca^{2+} et K^{+}, les lipides, les glucides réducteurs et la cellulose brute dans les catégories des feuilles et dans les résidus de la digestion larvaire par des lots, en établissant la valeur nutritive meilleure des feuilles immatures et la production de soie accrue à la suite de leur consommation.

BIBLIOGRAFIE

1. Davidescu D., Ionescu M., Ivănescu M., Pavlovschi Gh., Sluşanschi H., *Metode de analiză chimice şi fizice folosite în agricultură*. Ed. Acad. RSR, 114, 1963.
2. El-Shaaravy M. F., Gomaa A. A., El-Garhi A. T., Zeitschrift für angewandte Entomology. West Berlin, *78*, 171, 1975.
3. Gian Tsin Gan, Liu Fan, Fen Huei, Acta entomol. sinica. R. P. Chineză, *12*, 412, 1963.
4. Matsuoka M., Bull. Seric. Exp. Station. Japonia, *19*, 499, 1965.
5. Rada P., Girish Ch. N., Proceed. of the Indian National Sci. Academy, p. Biochem, *79*, 230, 1974.

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 9— 14 (1977)

STUDIU METODOLOGIC COMPARATIV PENTRU DOZAREA ENZIMATICĂ A UREEI SERICE

CEZARINA CUCU

Rezumat. — S-au studiat comparativ două metode enzimatice de determinarea nivelului seric al ureei, metode ce diferă în ce privește principiul de colorare finală al amoniacului eliberat în reacție — colorare cu reactiv Berthelot și colorare cu reactiv Nessler.
Din analiza statistică a datelor obținute prin investigarea a 100 de subiecți, se constată că cele două metode dau rezultate satisfăcătoare și comparabile între ele, metoda ce folosește reactiv Berthelot prezentînd cîteva avantaje în plus: stabilitatea culorii finale într-un interval de timp mai mare, reproductibilitate mai bună, durată de lucru mai redusă, reactivi stabili și ușor de preparat.

În laboratorul clinic, determinarea nivelului seric al ureei joacă un rol important legat de precizarea diagnostică. Concentrația acestui component biochimic poate fi determinată printr-un număr mare de metode, metode ce au la bază principii variate : metode volumetrice (metoda Kowarski) (1), metode gravimetrice (metoda Fosse) (2), colorimetrice (metoda cu diacetil-monoximă) (3), și metode enzimatice (4, 5).

Creșterea continuă a numărului analizelor biochimice curente cerute în investigația medicală modernă, a impus găsirea unor metode adecuate, simple, reproductibile și specifice.

Metodele folosite azi în laboratoarele clinice pentru determinarea ureei, au la bază principiul hidrolizei enzimatice cu ajutorul ureazei — enzimă cu specificitate strictă față de substrat — cu formare de amoniac și bioxid de carbon (6,7).

Amoniacul astfel eliberat poate fi evaluat cantitativ prin diferite metode ; dintre acestea ne-am oprit la aplicarea a două reacții de culoare :

1) cu reactiv Nessler, amoniacul formează un compus galben — tetraiodomercuriatul de amoniu ;

2) cu reactiv Berthelot, amoniacul cuplat cu fenolatul de sodiu în prezența hipocloritului de sodiu, formează indofenoli de culcare albastră (4, 5).

În prezenta lucrare ne-am propus studierea comparativă a acestor două metode enzimatice de dozare a ureei, în scopul alegerii celei mai exacte, reproductibile și mai ușor adaptabile la determinări de serie mare.

MATERIAL ȘI METODE

S-a determinat nivelul seric al ureei la 100 subiecți, paralel prin cele două metode enzimatice, și s-au comparat datele obținute.

S-a avut în vedere, în acest studiu, atît stabilirea condițiilor optime de etalonare și determinare, cît și analiza statistică a datelor.

Metodele din literatură au fost parțial modificate în Laboratorul nostru în sensul următor :

— la metoda ce folosește reactiv Nessler, deproteinizarea s-a făcut cu defecant alcalin Sömogy ;

— la metoda ce folosește reactiv Berthelot am practicat o prealabilă diluție a serului și am modificat unii timpi de lucru față de metoda originală în sensul scurtării timpului de reacție hidrolitică.

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic calculîndu-se dreapta de regresie a celor două șiruri. De asemenea s-a calculat eroarea de estimație a acestei regresii, abaterea standard, eroarea probabilă precum și testul diferenței între medii.

Pentru analiza reproductibilității metodelor, s-a lucrat pe același „pool" de seruri, împărțite în 10 eșantioane, dozările făcîndu-se separat. S-a calculat media determinărilor, eroarea standard, coeficientul de variație și intervalul de siguranță.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru a verifica dacă hidroliza ureei de către urează este totală în condițiile de lucru stabilite, etalonările s-au efectuat atît pe o soluție stock de uree de 100 mg%, cît și pe o soluție stock de sulfat de amoniu de 220 mg %, corespunzătoare cu cea de uree în ceea ce privește numărul grupărilor aminice.

Astfel, în fig. 1, este reprezentată curba de etalonare a ureei folosind o soluție stock de uree de 100 mg % (a) și cea obținută din soluția de sulfat de amoniu (b), colorarea finală fiind efectuată cu reactiv Nessler. Fotocolorimetrarea s-a făcut pe un aparat SPEKOL la 420 nm. (fig. 1).

În figura 2 sînt reprezentate curbele de etalonare folosind aceeași soluție de uree și respectiv de sulfat de amoniu, dar colorarea finală a fost realizată cu reactiv Berthelot. Măsurătorile s-au făcut cu autoanalizorul L.K.B. — 7400 la 619 nm (fig. 2).

Din aceste grafice se constată că prin ambele procedee hidroliza ureei de către urează este totală, dreptele fiind aproape suprapuse peste cele obținute cu soluția de sulfat de amoniu.

Legea Beer — Lambert este respectată pînă la o concentrație de uree de 200 mg% pentru metoda ce folosește reactiv Berthelot, iar metoda ce folosește reactiv Nessler, este liniară pînă în jurul valorii de 100 mg%. În acest ultim caz se recomandă ca peste concentrația de 100 mg% să se ucreze cu diluție din supernatant. În cazul metodei ce folosește reactiv Berthelot, dacă concentrația de uree depășește valoarea de 200 mg%, se recomandă o diluție a componentului final de reacție.

Hemoglobina introduce o eroare nesemnificativă de 2 — 5 mg%.

Pentru ambele metode s-au calculat valorile medii, erorile standard, coeficienții de variație și intervalul de siguranță.

În tabelul 1 sînt oglindite aceste rezultate. Se observă diferența între coeficienții de variație ai celor două metode. (Tabelul 1).

Coeficientul de variație al metodei ce folosește reactiv Berthelot este aproape jumătate din valoarea coeficientului de variație al metodei ce folosește reactiv Nessler ($\pm$ 4,7 % față de $\pm$ 8,7 %).

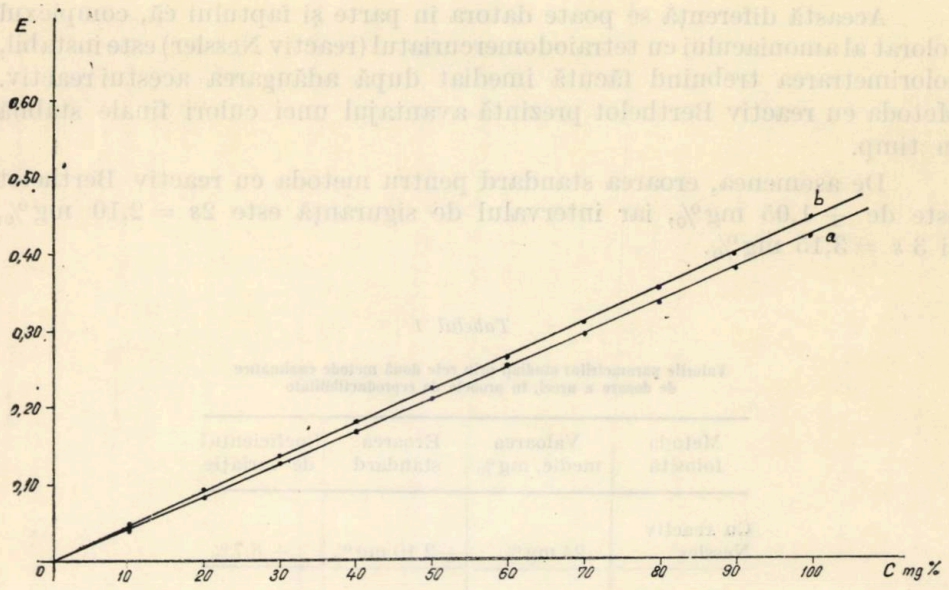


Fig. 1. — Curba de etalonare a ureei — soluție stock de 100 mg% — metoda cu reactiv Nessler (a) și curba de etalonare a soluției de sulfat de amoniu de 220 mg% (b).

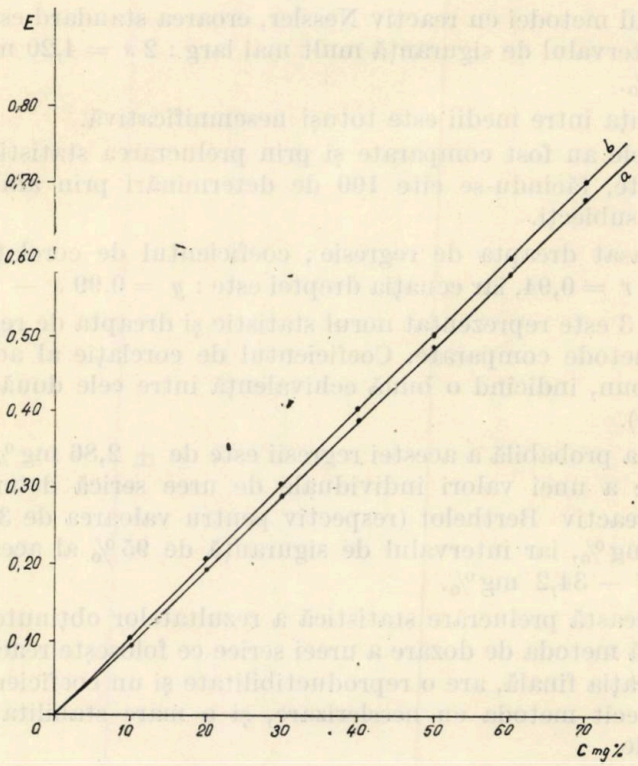


Fig. 2. — Curba de etalonare a ureei — soluție stock de 100 mg% — metoda cu reactiv Berthelot (a) și curba de etalonare a soluției de sulfat de amoniu de 220 mg% (b).

Această diferență se poate datora în parte și faptului că, complexul colorat al amoniacului cu tetraiodomercuriatul (reactiv Nessler) este instabil, colorimetrarea trebuind făcută imediat după adăugarea acestui reactiv. Metoda cu reactiv Berthelot prezintă avantajul unei culori finale stabilă în timp.

De asemenea, eroarea standard pentru metoda cu reactiv Berthelot este de $\pm$ 1,05 mg%, iar intervalul de siguranță este $2s = 2{,}10$ mg%, și $3\,s = 3{,}15$ mg%.

Tabelul 1

Valorile parametrilor studiați prin cele două metode enzimatice de dozare a ureei, în probele de reproductibilitate

Metoda folosită	Valoarea medie, mg%	Eroarea standard	Coeficientul de variație
Cu reactiv Nessler	24 mg%	$\pm$ 2,10 mg%	$\pm$ 8,7%
Cu reactiv Berthelot	22 mg%	$\pm$ 1,05 mg%	$\pm$ 4,7%

În cazul metodei cu reactiv Nessler, eroarea standard este de $\pm$ 2,10 mg%, iar intervalul de siguranță mult mai larg : $2\,s = 4{,}20$ mg% și $3\,s = 6{,}30$ mg%.

Diferența între medii este totuși nesemnificativă.

Metodele au fost comparate și prin prelucrarea statistică a rezultatelor obținute, făcîndu-se cîte 100 de determinări prin ambele metode, pe aceiași subiecți.

S-a trasat dreapta de regresie ; coeficientul de corelație al acestei regresii este $r = 0{,}94$, iar ecuația dreptei este : $y = 0{,}99\,x - 0{,}1$.

În fig. 3 este reprezentat norul statistic și dreapta de regresie pentru cele două metode comparate. Coeficientul de corelație al acestei regresii este foarte bun, indicînd o bună echivalență între cele două metode studiate (fig. 3).

Eroarea probabilă a acestei regresii este de $\pm$ 2,86 mg%, iar eroarea de estimație a unei valori individuale de uree serică determinată prin metoda cu reactiv Berthelot (respectiv pentru valoarea de 30 mg%) este de $\pm$ 4,28 mg%, iar intervalul de siguranță de 95% al acestei estimații este de 25,7 — 34,2 mg%.

Din această prelucrare statistică a rezultatelor obținute se evidențiază faptul că metoda de dozare a ureei serice ce folosește reactiv Berthelot pentru colorația finală, are o reproductibilitate și un coeficient de variație mai bune decît metoda cu nesslerizare, și o mare stabilitate în timp a culorii finale.

Metoda cu nesslerizare prezintă însă avantajul că poate folosi ca sursă de urează şi făina de soia ca atare, turbiditatea mediului fiind îndepărtată prin defecare.

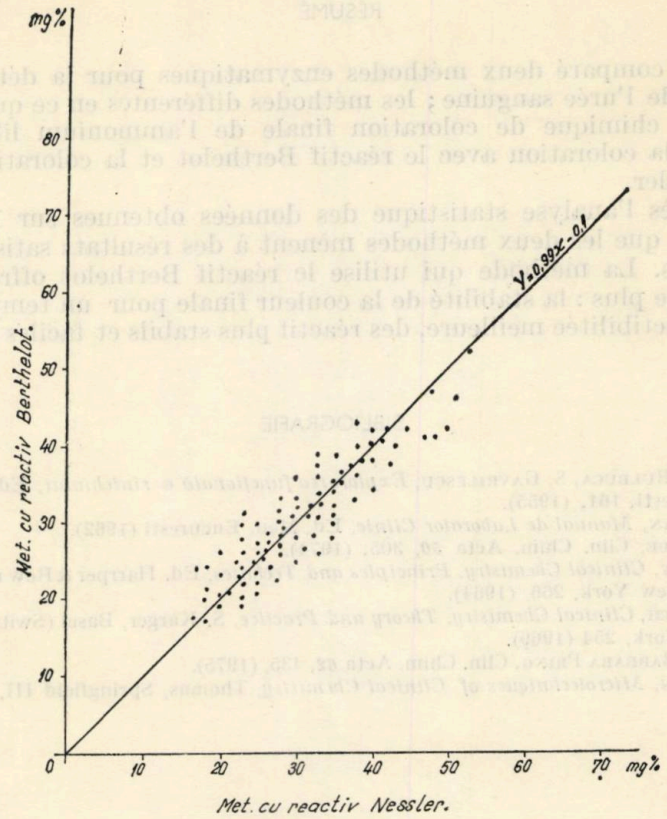


Fig. 3. — Norul statistic şi dreapta de regresie pentru corelaţia celor două metode comparate.

CONCLUZII

1. Studierea comparativă a celor două metode enzimatice pentru determinarea ureei serice şi analizarea statistică a rezultatelor obţinute, subliniază avantajul folosirii metodei cu reactiv Berthelot şi o recomandă pe aceasta pentru determinarea ureei în laboratoarele clinicei moderne şi pentru serii zilnice mai mari.

2. Metoda cu nesslerizare poate utiliza ca sursă de ureează şi făina de soia ca atare, avantaj pentru laboratoarele clinice mai puţin dotate.

Prezentat la redacţie 2 dec. 1976

Inst. de medicină internă
„N. GH. LUPU"

L'ÉTUDE MÉTHODOLOGIQUE COMPARATIVE POUR LA DÉTERMINATION DU NIVEAU DE L'URÉE SÉRIQUE

RÉSUMÉ

Ou a comparé deux méthodes enzymatiques pour la détermination du niveau de l'urée sanguine ; les méthodes différentes en ce qui concerne le principe chimique de coloration finale de l'ammonium liberé de la réaction — la coloration avec le réactif Berthelot et la coloration avec le réactif Nessler.

D'après l'analyse statistique des données obtenues sur 100 sujets, on constate que les deux méthodes mènent à des résultats satisfaisants et comparables. La méthode qui utilise le réactif Berthelot offre quelques avantages de plus : la stabilité de la couleur finale pour un temps illimité, une reproductibilitée meilleure, des réactif plus stabils et faciles à préparer.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Zosin, I. Bulbuca, S. Gavrilescu, *Explorarea funcțională a rinichiului*, Ed. Med. București, 161, (1955).
2. S. Comorosan, *Manual de Laborator Clinic*, Ed. Med. București (1962).
3. Hina Nishibe, Clin. Chim. Acta *50*, 305, (1974).
4. R. Y. Henry, *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, Ed. Harrper & Row med. Division, New York, 266, (1964).
5. R. Richterich, *Clinical Chemistry, Theory and Practice*, S. Karger, Basel (Switzerland), New York, 254 (1969).
6. Yames and Barbara Pring, Clin. Chim. Acta *62*, 435, (1975).
7. S. Natelson, *Microtechniques of Clinical Chemistry*, Thomas, Springfield III, 2-nd, (1961).

HIDROXIPROLINA URINARĂ NEDIALIZABILĂ — UN NOU TEST PENTRU DEPISTAREA MALADIILOR TIROIDIENE

ELENA GANEA

Rezumat. — S-a determinat hidroxiprolina urinară nedializabilă la un număr de indivizi normali şi pacienţi cu diferite tulburări ale funcţiei tiroidiene. Valorile obţinute au fost corelate cu cele ale iodului hormonal plasmatic (PBI), la aceiaşi indivizi. Calculul statistic ne-a condus la un indice de corelaţie foarte apropiat de 1.
Cele două şiruri de valori se înscriu pe o curbă de forma unei parabole de gradul II. Se calculează ecuaţia curbei şi se reprezintă grafic. Valorile hidroxiprolinei şi PBI-ului verifică pe curba obţinută. Sugerăm introducerea valorilor hidroxiprolinei urinare nedializabile în ecuaţia dată pentru aflarea PBI-ului în cazurile cînd acesta nu se poate determina.

În elaborarea acestui test am pornit de la constatarea făcută de Haddad şi col. (1) că hidroxiprolina din alimentaţie influenţează eliminarea urinară a hidroxiprolinei libere cît şi a peptidelor mici dializabile, provenite din degradarea colagenului, fără a modifica valoarea peptidelor hidroxiprolinice nedializabile. Acestea ar putea constitui un parametru mult mai exact în determinarea unor tulburări tiroidiene decît hidroxiprolina liberă urinară, în special în cazul bolnavilor nespitalizaţi, cînd păstrarea unui regim strict, lipsit de colagene este mai puţin riguroasă. Ne-am propus aşadar să urmărim modul în care hidroxiprolina urinară nedializabilă reflectă modificările colagenului în tireopatii şi am ajuns astfel la stabilirea unui test simplu şi precis pentru depistarea maladiilor tiroidiene.

MATERIAL ŞI METODE

S-a colectat urina din 24 ore, pe toluen, la +4°C, de la indivizi normali şi pacienţi cu tulburări tiroidiene. O alicotă de urină s-a filtrat şi s-a dializat 24 ore la +4°C, faţă de apă distilată; apoi s-a hidrolizat cu HCl concentrat v/v, 3 ore la 120°C şi s-a determinat hidroxiprolina printr-o metodă descrisă anterior (2).

Pentru aprecierea funcţiei tiroidiene, s-a determinat iodul hormonal plasmatic (PBI), după metoda descrisă de Dinulescu şi Ganea (3) pentru ţesut tiroidian, cu ajutorul aparatului Technicon Autoanalyser.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Valorile hidroxiprolinei urinare dializabile, cît şi ale PBI sînt date în tabela 1.

Indicele de corelaţie (0,92), fiind foarte apropiat de 1 arată o foarte bună corelaţie între cele două şiruri de valori.

Deci funcţia tiroidiană poate fi exprimată fidel prin valoarea hidroxiprolinei urinare nedializabile.

Tabela 1

Valorile hidroxiprolinei urinare nedializabile (x, mg/24 ore) şi ale PBI (y, ug%)

x	y
0,26	2,50
0,37	3,50
0,40	7,00
0,60	7,50
1,00	8,00
1,50	8,25
2,40	11,50
2,80	12,75
3,60	14,00
5,60	15,75

Din dispersia acestor valori am observat că ele se înscriu în jurul unei curbe de forma unei parabole de gradul 2, cu ecuaţia : $y = ax^2 + bx + c$.

Pentru perechi de valori alese din tabela 1 ($x = 0{,}26$ $y = 2{,}50$; $x = 1{,}50$ $y = 8{,}25$; $x = 5{,}60$ $y = 15{,}75$), calculul constantelor a, b, c, ne conduce la ecuaţia

$$y = -0{,}5258x^2 + 5{,}5626x + 1{,}09 \qquad (I)$$

Punctele necesare reprezentării curbei sînt pentru $y = 0$

$$x_1 = -0{,}19237$$

$$x_2 = 10{,}7715$$

pentru $x = 0$ $y = 1{,}09$

$$x_v = \frac{x_1 + x_2}{2} = 5{,}29.$$

Introducînd pe x_v în ecuaţia (I) obţinem

$$y_v = -0{,}5258x_v^2 + 5{,}5625x_v + 1{,}09 = 15{,}78.$$

Folosind aceste 4 puncte obţinem parabola din figura 1.

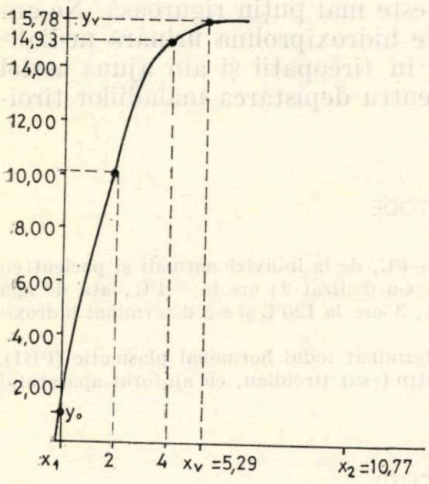


Fig. 1. — Curba variaţiei hidroxiprolinei urinare nedializabile cu PBI. pe abscisă: hidroxiprolina urinară nedializabilă (mg./24 ore); pe ordonată: PBI(µg.%)

Verificînd valorile noastre pe curba obţinută se constată o foarte bună suprapunere :

pentru $x = 0{,}37$ $y = 3{,}076$

$x = 2{,}8$ $y = 12{,}64$

$x = 4$ $y = 14{,}93$

Se vede că y calculat din ecuaţie are valori foarte apropiate de cele din tabel.

Din cele arătate mai sus reiese o foarte bună corelaţie între valoarea hidroxiprolinei nedializabile din urină şi a PBI, ceea ce poate servi ca indice al funcţiei tiroidiene. De asemenea, în cazurile în care PBI nu poate fi determinat în laborator, valoarea sa fiind alterată de consumul unor medicamente pe bază de iod, mărimea sa poate fi dedusă din curba prezentată.

O relaţie între hidroxiprolina urinară şi PBI au mai prezentat Kivirikko şi col. (4) şi Uitto şi col. (5), referindu-se însă la hidroxiprolina

totală. Pe lîngă avantajul că este independent de prezența colagenului în alimentație, parametrul ales de noi mai prezintă și altele.

Unul din acestea este faptul că relația găsită de noi se verifică atît pentru normali cît și pentru hiper- sau hipotiroidieni (PBI normal 4 — 8 μg%), în timp ce curbele prezentate de autorii citați sînt valabile numai pentru hipertiroidism, nu și pentru hipotiroidism.

Pe de altă parte, metoda noastră se poate aplica și pentru valorile mari de hidroxiprolină eliminată în mod normal la copii, avantaj semnificativ față de metoda propusă de autorii menționați. Caracterul de aplicabilitate generală a metodei noastre este justificat și de datele lui Langness și Behnke (6), care au arătat că protein- hidroxiprolina serică, sursă a hidroxiprolinei urinare nedializabile, nu prezintă variații în raport cu vîrsta.

Testul propus este cu atît mai adecvat pentru maladiile tiroidiene, cu cît studiile cu izotopi ale lui Krane și col. (7) au arătat că peptidele hidroxiprolinice nedializabile din urină au o structură foarte asemănătoare colagenului, provenind dintr-un „pool" cu timp de înjumătățire scurt: fie colagenul nou sintetizat și rapid degradat, fie fragmente de colagen sintetizate și neîncorporate în tropocolagen. Modificarea valorilor hidroxiprolinei urinare nedializabile ar indica, așadar, turnoverul crescut sau scăzut al colagenului, specific hiper- respectiv hipotiroidismului.

CONCLUZII

1. S-a constatat o corelație strînsă ($r = 0{,}92$) între valorile hidroxiprolinei urinare nedializabile și ale PBI.
2. Relația amintită se exprimă prin ecuația
$y = -0{,}5258x^2 + 5{,}5625x + 1{,}09$.
3. Reprezentarea grafică a acestei ecuații este o parabolă de gradul II, din care se pot deduce valorile PBI, cunoscînd valorile hidroxiprolinei urinare nedializabile.
4. Testul propus se poate aplica indiferent de grupa de vîrstă a pacienților.
5. Valabilitatea acestui test se extinde de la aprecierea stării funcționale normale a tiroidei, la hipo- și hipertiroidism.

Mulțumesc dr. Horia Stancu, de la Institutul de Endocrinologie „Dr. C. I. Parhon", pentru procurarea materialului experimental.

Prezentat la redacție la 4 decembrie 1976

Institutul de științe biologice
Colectivul de proteine

URINARY NONDIALYSABLE HYDROXYPROLINE — A NEW TEST FOR THYROID DISEASES DETECTING

SUMMARY

Urinary nondialysable hydroxyproline was determined in normal subjects and patients with thyroid diseases. The values obtained were correlated with hormonal plasmatic iodine (PBI). Statistical computation leads to a correlation coefficient near 1.

curbe logaritmice (fig. 1). La valori ce depășesc 3μg/ml pentru hidroxiprolina serică liberă și 30 mg/24 ore pentru cea urinară totală nu se obține o creștere corespunzătoare a acidului neuraminic. De asemenea, la valori foarte mari ale acidului neuraminic nu se întîlnește o creștere corespunzătoare a hidroxiprolinei.

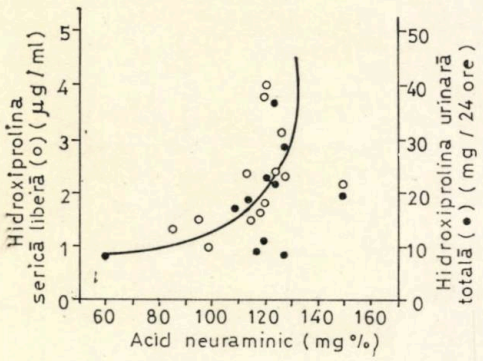


Fig. 1. — Reprezentarea valorilor hidroxiprolinei libere serice și a hidroxiprolinei urinare totale în funcție de nivelul seric al acidului neuraminic.

Pentru a explica relația logaritmică obținută cît și lipsa unei corelații în cazul valorilor foarte mari, trebuie să cunoaștem proveniența și semnificația acidului neuraminic în cazurile studiate.

Se știe că acidul neuraminic este o componentă a substanței fundamentale a țesutului conjunctiv, modificările căreia însoțesc pe cele ale fibrelor de colagen în cursul tulburărilor tiroidiene (8).

Velican și Cinca (9) au sugerat că acidul neuraminic acționează ca factor de protecție sterică a fibrelor de colagen din matricea osoasă față de efectele degradante ale colagenazei. Rolul protector al acidului neuraminic față de acțiunea unor enzime proteolitice a mai fost demonstrat și în cazul altor glicoproteine (10, 11).

Ca urmare, creșterea degradării colagenului în hipertiroidism se pare că se extinde și asupra glicoproteinelor substanței fundamentale, fapt susținut și de corelația între valorilor hidroxiprolinei și acidului neuraminic, prezentate în lucrarea de față. Într-un stadiu de degradare și mai avansat, cînd valorile hidroxiprolinei devin mai mari, acidul neuraminic rămîne constant, sau crește foarte puțin (fig. 1). Aceasta s-ar putea explica prin inhibarea sintezei mucoproteinelor țesutului conjunctiv de către hormonii tiroidieni, relatată și de Josza și Lusztig (12). Prezența unor valori mici de hidroxiprolină în cazul valorilor foarte mari de acid neuraminic (150 mg%, fig. 2), deși insuficiente ca număr pentru a trage o concluzie sugerează totuși o creștere a sintezei unor mucopolizaharide, așa cum am arătat anterior (4), în hipotiroidism.

Rezultatele noastre s-ar mai putea interpreta și în legătură cu sinteza hormonilor tiroidieni, acidul neuraminic fiind un component al părții glucidice din molecula tiroglobulinei (13).

S-ar mai putea lua în considerație și biosinteza hidroxiprolinei libere din acid neuraminic, cu atît mai mult cu cît din rezultatele noastre se observă o corelație mai bună a valorilor acidului neuraminic cu hidroxiprolina liberă din ser, decît cu cea totală din urină. Totuși, calea de biosinteză menționată mai sus pare a fi neesențială (14).

Relația hidroxiprolină — tirozină. Modificarea turnoverului colagenului în funcție de nivelul seric al hormonilor tiroidieni, exprimat ca iod hormonal plasmatic (PBI), a fost relatată de unii autori (15); totuși, relativ la aminoacidul care stă la baza structurii acestor hormoni, tirozina, nu există niciun fel de indicații în sensul celor menționate mai sus.

Ca urmare, în lucrarea de față ne-am propus să urmărim modificările valorilor hidroxiprolinei în ser și urină, ale tirozinei plasmatice, paralel cu cele ale iodului hormonal plasmatic (PBI). Rezultatele sînt date în tabela I.

Tabela I

Hidroxiprolina urinară totală mg/24 ore	Hidroxiprolina serică liberă µg/ml	Tirozina plasmatică µg/ml	PBI µg%
10,50	1,8	22,80	12,50
23,30	3,8	17,50	15,75
23,10	—	33,15	11,50
17,03	3,0	22,20	12,75
15,00	1,6	26,90	16,75
21,80	2,4	25,00	14,00
36,90	4,0	65,00	12,75
18,90	2,4	14,00	7,00
22,10	1,6	17,40	8,00
38,22	1,4	27,00	8,25
8,90	1,8	18,40	7,50
8,20	—	20,00	8,50
50,16	1,0	19,40	7,50
29,40	2,4	18,15	—

Reprezentînd grafic aceste valori, obținem o distribuție a valorilor și o curbă de regresie așa cum se vede în figura 2.

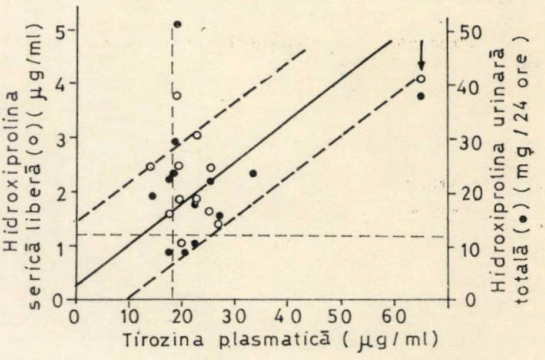


Fig. 2. — Reprezentarea valorilor hidroxiprolinei în funcție de tirozina plasmatică. Linia verticală și cea orizontală corespund valorilor medii ale hidroxiprolinei serice libere, respectiv tirozinei plasmatice. Dreapta oblică continuă este dreapta de regresie; dreptele oblice punctate se află față de dreapta de regresie la o distanță = 2 e.s.

Din figură se observă o tendință de grupare a valorilor în jurul curbei de regresie ± 2 e.s. Pentru punctele cuprinse între cele două drepte perpendiculare și extremele oblice, corespund în tabela I cele mai mari valori ale PBI. Zona din grafic amintită cuprinde deci puncte ce indică

Relația hidroxiprolină — tirozină. Modificarea turnoverului colagenului în funcție de nivelul serie al hormonilor tiroidieni, exprimat ca iod hormonal plasmatic (PBI), a fost relatată de unii autori (15): totuși, relativ la aminoacidul care stă la baza structurii acestor hormoni, tirozina, nu există niciun fel de indicații în sensul celor menționate mai sus.

Ca urmare, în lucrarea de față ne-am propus să urmărim modificările valorilor hidroxiprolinei în ser și urină, ale tirozinei plasmatice, paralel cu cele ale iodului hormonal plasmatic (PBI). Rezultatele sînt date în tabela I:

Tabela I

Hidroxiprolina urinară totală mg/24 ore	Hidroxiprolina serică liberă µg/ml	Tirozina plasmatică µg/ml	PBI µg%
10,30	1,8	22,80	12,50
23,30	3,8	17,50	15,75
23,10	—	33,15	11,50
17,03	3,0	22,20	12,75
15,00	1,6	26,90	16,75
21,80	2,1	25,00	14,00
36,90	4,0	65,00	12,75
18,90	2,1	14,00	7,00
22,10	1,6	17,40	8,00
38,22	1,1	27,00	8,25
8,90	1,8	18,40	7,50
8,20	—	20,00	8,50
50,16	1,0	19,40	7,50
29,40	2,4	18,15	

Reprezentînd grafic aceste valori, obținem o distribuție a valorilor și o curbă de regresie așa cum se vede în figura 2.

Fig. 2. — Reprezentarea valorilor hidroxiprolinei în funcție de tirozina plasmatică. Linia verticală și cea orizontală corespund valorilor medii ale hidroxiprolinei serice libere, respectiv tirozinei plasmatice. Dreapta oblică continuă este dreapta de regresie; dreptele oblice punctate se află față de dreapta de regresie la o distanță = 2 e.s.

Din figură se observă o tendință de grupare a valorilor în jurul curbei de regresie ± 2 e.s. Pentru punctele cuprinse între cele două drepte perpendiculare și extremele oblice, corespund în tabela I cele mai mari valori ale PBI. Zona din grafic amintită cuprinde deci puncte ce indică

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 25—30 (1977)

ACTIVITATEA UNOR OXIDOREDUCTAZE ŞI HIDROLAZE DIN GINGIA UMANĂ NORMALĂ ŞI PATOLOGICĂ

STELA GHEŢIE, POLINA PIRCU, AURORA POPESCU

Rezumat. — S-a determinat, prin metode de analiză biochimică, activitatea unor oxidoreductaze şi hidrolaze din gingia umană normală şi cu maladii cronice periodontale. S-au analizat oxidoreductazele: lactatdehidrogenaza, malatdehidrogenaza, glucozo-6-P-dehidrogenaza, peroxidaza şi hidrolazele: L-leucilaminopeptidaza, fosfataza acidă şi fosfataza alcalină.
Determinările au arătat că în gingia umană normală toate oxidoreductazele cercetate prezintă activităţi apreciabile. În unele boli periodontale se produc modificări ale activităţii lor, fiind crescute activitatea lactatdehidrogenazei şi malatdehidrogenazei şi scăzută activitatea glucozo-6-P-dehidrogenazei. În ceea ce priveşte activitatea hidrolazelor cercetate, în bolile periodontale (parodontopatii) sînt crescute semnificativ activităţile fosfatazelor şi este scăzută activitatea L-leucilaminopeptidazei. În diverse tipuri de parodontopatii unele din enzimele studiate prezintă modificări specifice.

Principalii constituenţi de interes biochimic din parodonţiu normal şi patologic sînt cunoscuţi de multă vreme. Însă, cercetări referitoare la rolurile metabolice ale unora din ei nu s-au făcut decît în ultimii 10 — 15 ani. Dintre aceşti constituenţi, un interes deosebit prezintă enzimele. Într-adevăr, studiul bogatului echipament enzimatic al parodonţiului uman (1 — 10, 12) şi provenind de la diverse specii de animale (6, 11, 13, 14), a furnizat informaţii preţioase atît cu privire la marea varietate de enzime aflate în ţesutul respectiv cît şi în ceea ce priveşte multiplele procese biochimice desfăşurate la acest nivel. Este de remarcat însă că determinările enzimatice din parodonţiu s-au făcut — mai cu seamă — prin metode histochimice(5 — 10, 12 — 15) şi în mult mai mică măsură prin metode biochimice, cantitative (1, 3, 4, 11).

Considerînd că acest ultim gen de metode ne-ar ajuta la conturarea mai precisă a proceselor biochimice din parodonţiu, ne-am propus ca — în lucrarea de faţă — să determinăm prin metode de analiză biochimică activitatea unor oxidoreductaze şi hidrolaze din gingia umană normală şi cu parodontită marginală cronică. Studiul hidrolazelor s-a impus cu atît mai mult cu cît din unele cercetări histochimice anterioare, efectuate pe animale de experienţă (16 — 20), reiese că diverse hidrolaze ar fi implicate în procesele inflamatorii gingivale.

MATERIAL ŞI METODE

Determinările s-au efectuat pe ţesut gingival proaspăt recoltat intraoperator, obţinut de la serviciile de specialitate.

Pentru dozarea activităţilor enzimatice s-au preparat omogenate de gingie, în diverse medii şi concentraţii diferite, prin triturare cu nisip de cuarţ 5 minute. Omogenatele s-au

Tabela 2

Activităţile unor oxidoreductaze şi hidrolaze în parodonţiul lezat corespunzînd diverselor cazuri de parodontită marginală cronică

Enzima	Tipul de parodontită marginală cronică	Numărul cazurilor analizate	Activităţile enzimatice *	
			Valori medii	Valori extreme
Lactat-dehidrogenaza	Superficială	4	217,94	134,82—248,70
	Profundă	6	291,43	153,15—342,95
	Avansată	7	366,85	163,62—448,97
	Atrofică	1	250,01	—
	Hiperplazie gingivală	1	217,29	—
Malat-dehidrogenaza	Superficială	6	15,71	14,07— 16,85
	Profundă	4	22,12	20,03— 25,13
	Avansată	8	25,37	16,17— 30,91
	Gingivită marginală	1	15,69	—
Glucozo-6-P-dehidrogenaza	Superficială şi de intensitate medie	7	68,57	60 — 80
	Profundă	3	43,33	40 — 50
	Profundă cu involuţie senilă	1	20,00	—
	Avansată şi foarte avansată	7	38,57	20 —40
	Atrofică	2	20,00	20 —20
Peroxidaza	Superficială şi de intensitate medie	9	0,719	0,450—1,350
	Profundă	2	0,175	0,100—0,250
	Profundă cu involuţie senilă	2	0,052	0,050—0,055
	Avansată	6	0,196	0,100—0,225
	Atrofică	1	0,100	—
L-leucilamino-peptidaza	Superficială	5	49,21	46,03—54,23
	Profundă	12	49,31	43,65—54,23
	Diverse tipuri (acutizată, avansată, atrofică)	8	49,79	44,97—56,35
Fosfataza acidă	Profundă	5	39,78	36,60—43,14
	Avansată	5	38,14	32,67—47,05
	Acutizată	1	77,12	—
	Hiperplazică	1	40,52	—
Fosfataza alcalină	Superficială	2	93,74	90,62— 96,86
	Profundă	10	126,86	92,12—164,06
	Avansată	4	154,29	101,56—207,81
	Acutizată	2	109,73	92,91—126,56
	Atrofică	1	95,27	—
	Hiperplazică	2	107,93	100,92—114,95

* Unităţile în care sînt exprimate s-au menţionat în text

nazei ; ceea ce denotă că și degradarea oxidativă este mai intensă în parodonțiul lezat profund decît în cel superficial.

Activitatea glucozo-6-P-dehidrogenazică cea mai mare se întîlnește în parodontita superficială și de intensitate medie ; ceea ce denotă că în aceste afecțiuni procesele degradative pe calea fosfogluconatului sînt mai intense decît în cazul celorlalte tipuri de parodontită (profundă, avansată, profundă cu involuție senilă și atrofică). O situație similară cu cea prezentată de glucozo-6-P-dehidrogenaza se întîlnește și în cazul peroxidazei. Într-adevăr, după cum reiese din datele tabelelor 1 și 2, în parodontita superficială valoarea activității peroxidazice este aproape dublă față de valoarea medie a activității acestei enzime, găsită la toate cazurile de parodontită marginală cronică cercetate.

În ceea ce privește activitatea L-leucilaminopeptidazei, nu se constată modificări semnificative ale activității enzimei în funcție de natura parodontitei marginale cronice (superficială, profundă sau de alte tipuri).

Cea mai mare activitate a fosfatazei acide se întîlnește în parodontita acutizată (aproape dublă față de medie) ; apoi, valori apropiate de medie se găsesc în celelalte tipuri de parodontită marginală cronică. Deși în cazurile analizate s-a întîlnit unul singur de parodontită acutizată, valoarea activității enzimatice așa de mare prezentată în acest caz tinde să arate că în procesul acut ar avea loc o netă intensificare a degradărilor hidrolitice catalizate de fosfataza acidă.

Cea mai mare activitate a fosfatazei alcaline se întîlnește în parodontita marginală cronică avansată ; apoi, valori mai mici (apropiate de medie) se constată în parodontita profundă și valori reduse în parodontita superficială sau acutizată. Aceste date pledează pentru scăderea proceselor degradative de hidroliză—catalizate de fosfataza alcalină — în parodonțiul lezat, din interior spre suprafață.

CONCLUZII

În țesutul gingival normal și patologic, cu parodontită marginală cronică de diverse tipuri, studiate în lucrarea prezentă, au loc procese enzimatice intense. Unele din acestea sînt perturbate în țesutul lezat ; astfel, se intensifică procesele oxidative majore, anaerobe și aerobe (glicoliză, ciclul ATC) și se reduc procesele oxidative prin calea fosfogluconatului ; se intensifică unele procese hidrolitice catalizate de fosfataze.

Prezentat la redacție la 29 martie 1976

Facultatea de medicină
Catedra de chimie biologică
I.M.F. București

THE ACTIVITY OF SOME OXIDO-REDUCTASES AND HYDROLASES IN HUMAN NORMAL AND PATHOLOGICAL GINGIVA

SUMMARY

The activity of some oxido-reductases (lactate-, malate-, glucoso-6P-dehydrogenase, peroxidase) and hydrolases (L-leucine aminopeptidase, acid and alkaline phosphatases) in human normal gingiva and with chro-

3. *Determinarea greutăţilor moleculare.* Pentru determinarea greutăţilor moleculare a fracţiunilor proteice obţinute prin gel-filtrare s-au folosit metodele indicate de Andrews (5) şi Hanson şi Jonhanson (6). S-au trecut pe aceeaşi coloană de Sephadex G-75 respectînd condiţiile de lucru de la gel-filtrare, albumină serică bovină fracţiunea V, pepsină, lizozim şi Blue dextran.

4. *Determinarea concentraţiei proteice.* Concentraţia proteică a extractelor ultrasonate şi a celor provenite de la moara coloidală s-a determinat prin metoda Lowry (7) şi prin citirea probelor la spectrofotometru la 230 nm, cu întrebuinţarea curbelor standard trasate cu albumină serică bovină.

5. *Determinarea activităţilor proteolitice.* Activitatea proteolitică s-a determinat după metoda indicată de Press şi Porter (8) întrebuinţîndu-se hemoglobină denaturată acid ca substrat iar ca enzimă extractele ultrasonate şi fracţiunile obţinute prin gel-filtrarea pe Sephadex G-75.

Determinarea activităţii enzimatice s-a făcut în modul următor: peste 1 ml hemoglobină 1,5% de pH dorit se adaugă 0,3 ml tampon de acelaşi pH şi 0,2 ml enzimă. Se incubează 1 oră la 37°C, după care reacţia se stopează prin adăugarea a 2 ml TCA 10%. Probele martor se obţin prin adăugarea celor 2 ml TCA 10% înaintea incubării. După filtrare se citeşte extincţia soluţiilor la spectrofotometru, la 280 nm. Activitatea specifică se obţine prin raportarea diferenţei extincţiilor probei şi martorului la concentraţia proteică iniţială ($\Delta E/c$)

6. *Concentrarea* piscurilor de la gel-filtrare s-a făcut prin perevaporare, concomitent cu dializă contra apă distilată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Separarea proteinelor din extracte de ultrasonare, prin gel-filtrare Sephadex G-75

S-a lucrat cu nămoluri active martor (1), intoxicat 24 ore (2), intoxicat 6 zile (3) şi intoxicat 20 zile (4). Din primele trei probe s-au extras proteinele prin ultrasonare, din proba 4 proteinele s-au extras în moara coloidală. Trecerea acestor probe pe Sephadex G-75 a condus la separările date în fig. 1 pentru nămolul martor (1), în fig. 2 pentru nămolul intoxicat 24 ore (2), în fig. 3 pentru nămolul intoxicat 6 zile (3) şi în fig. 4 pentru nămolul intoxicat 20 zile (4).

În vederea stabilirii modificărilor suferite în greutăţile moleculare de către extractele normale şi intoxicate, am trecut pe aceeaşi coloană de Sephadex G-75 o serie de substanţe cu Blue dextranul, albumina, pepsina şi lizozimul cu greutăţi moleculare cunoscute. Separarea lor este dată în fig. 5.

Extractele proteice obţinute prin ultrasonare dau aceeaşi separare în două piscuri ca extractele de la moara coloidală, piscul I, cu o greutate moleculară peste 70 000 şi piscul II, cu o greutate moleculară sub a lizozimului. Acest pisc se desface în două, dînd piscul III care nu apare la toate nămolurile active. Intoxicarea nămolului, timp de 24 ore (fig. 2) a condus la scindarea piscului I în I şi I′ urmat de un început de scindare a piscului II (umărul ramurei ascendente). Intoxicarea nămolului timp de 6 zile a condus la separarea din fig. 3, cu prezenţa unui pisc I mai lat şi cu un umăr în ramura lui descendentă, a piscului II despărţit în II şi II′(II′ provenit din umărul ramurei ascendente a piscului II din fig. 2) şi a piscului III mult mai mare ca în fig. 1 şi fig. 2. După o intoxicare de 20 zile, se obţine separarea din fig. 4 care este netă, în piscul I şi II, corespunzător piscurilor respective de la nămolul normal. Nu se ştie dacă dispariţia piscului III se datoreşte timpului prelungit de intoxicare sau metodei diferite de extracţie. Se poate spune că prin intoxicare (24 ore — 6 zile) se despart din piscul I grupe de proteine cu greutate moleculară mai mică,

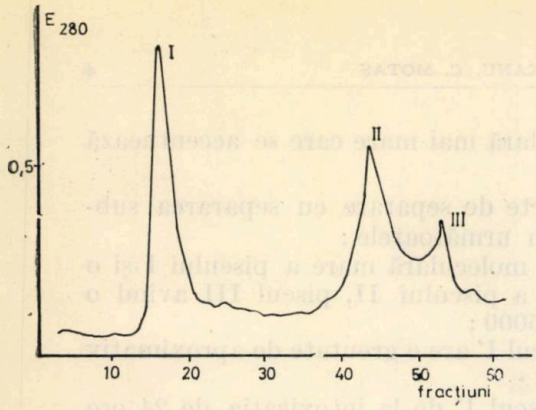


Fig. 1. — Gel-filtrarea pe Sephadex G-75 a extractului obținut prin ultrasonarea nămolului normal.

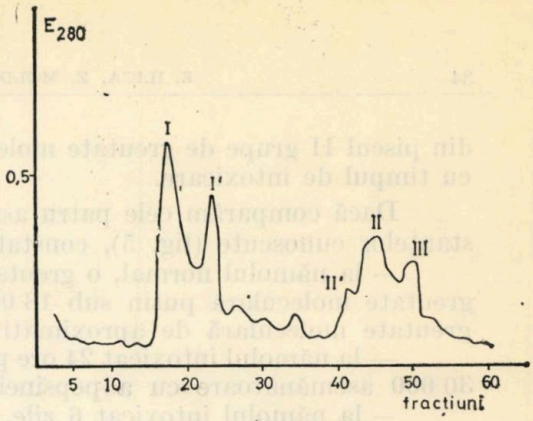


Fig. 2. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—75 a extractului obținut prin ultrasonarea nămolului intoxicat 24 ore.

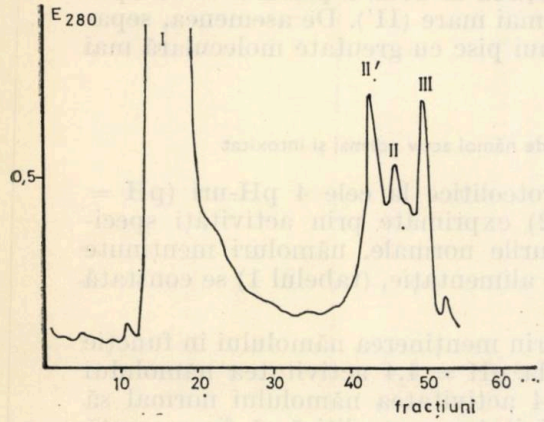


Fig. 3. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—75 a extractului obținut prin ultrasonarea nămolului intoxicat 6 zile.

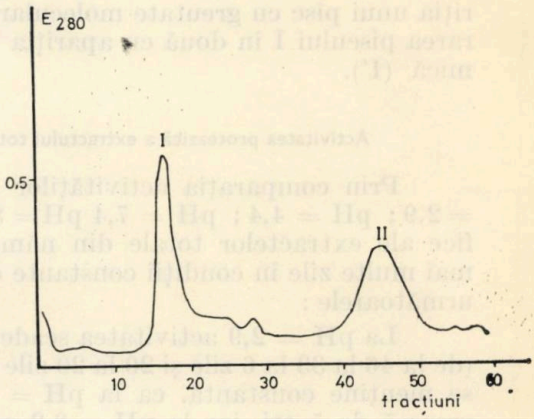


Fig. 4. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—75 a extractului obținut prin ultrasonarea nămolului intoxicat 20 zile.

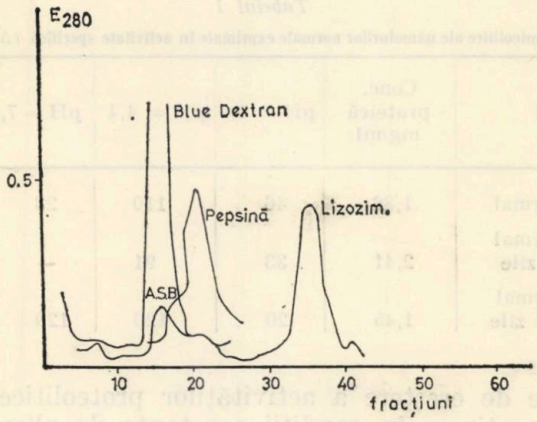


Fig. 5. — Gel-filtrarea pe Sephadex G—75 a următoarelor substanțe :

a) Blue dextran, GM 1 000 000 ; *b)* Albumină serică bovină, fracțiunea V, GM 70 000 ; *c)* Pepsină pură, GM 35 000 ; Lizozim GM 13 000

din piscul II grupe de greutate moleculară mai mare care se accentuează cu timpul de intoxicare.

Dacă comparăm cele patru aspecte de separare cu separarea substanțelor cunoscute (fig. 5), constatăm următoarele :

— la nămolul normal, o greutate moleculară mare a piscului I și o greutate moleculară puțin sub 13 000 a piscului II, piscul III avînd o greutate moleculară de aproximativ 5000 ;

— la nămolul intoxicat 24 ore piscul I' are o greutate de aproximativ 30 000 asemănătoare cu a pepsinei.

— la nămolul intoxicat 6 zile, piscul I' de la intoxicația de 24 ore poate fi prezent în umărul ramurei descendente a piscului I, din cauza unei separări mai puțin reușite (concentrația proteică prea mare pentru coloană), piscul II' se apropie de greutatea moleculară a lizozimului.

Este interesant de reținut despărțirea în două a piscului II cu apariția unui pisc cu greutate moleculară mai mare (II'). De asemenea, separarea piscului I în două cu apariția unui pisc cu greutate moleculară mai mică (I').

Activitatea protează a extractului total de nămol activ normal și intoxicat

Prin comparația activităților proteolitice la cele 4 pH-uri (pH = = 2,9 ; pH = 4,4 ; pH = 7,4 pH= 8,2) exprimate prin activități specifice ale extractelor totale din nămolurile normale, nămoluri menținute mai multe zile în condiții constante de alimentație, (tabelul 1) se constată următoarele :

La pH = 2,9 activitatea scade prin menținerea nămolului în funcție (de la 46 la 33 la 6 zile și 20 la 20 zile ; la pH = 4,4 activitatea nămolului se menține constantă, ca la pH = 7,4 activitatea nămolului normal să crească de 5 ori, iar la pH = 8,2 activitatea proteolitică să fie crescută doar de 2,5 ori.

Tabelul 1

Activitățile proteolitice ale nămolurilor normale exprimate în activitate specifică $(\Delta E/c) \times 10^{-3}$

Proba	Conc. proteică mg/ml	pH = 2,9	pH = 4,4	pH = 7,4	pH = 8,2
Nămol normal	1,36	46	110	23	36
Nămol normal după 6 zile	2,41	33	91	—	81
Nămol normal după 20 zile	1,45	20	120	120	82

Rezultatele de creștere a activităților proteolitice la pH alcalin, cu timpul de menținere în condiții constante de alimentare normală, sugerează modificări în echilibrul nămolului activ, cu mărirea posibilității eliberării în mediul de extracție a enzimelor din unele microorganisme. S-ar putea produce, fie o modificare a peretelui celular, cu eliberare de cantități

mai mari de proteaze intracelulare, fie o creștere de nuovo a activității proteolitice a unor microorganisme a căror pereți celulari și-au păstrat aceleași proprietăți.

Nămolurile intoxicate prezintă fluctuații mari în activitatea proteolitică în raport cu timpul de intoxicare, comparativ cu activitățile nămolului martor menținut același timp în condiții normale (tabelul 2) Astfel, la pH = 2,9 și 8,2, activitățile cresc după 24 ore și scad mult după 6 zile de intoxicare. La pH = 4,4 activitățile scad la 24 ore și cresc la 6 zile. Ceea ce este esențial este scăderea majoră a activităților proteolitice după 20 zile de intoxicare cu excepția pH—ului 2,9.

Tabelul 2

Activitățile proteolitce ale nămolurilor intoxicate timpi diferiți, comparativ cu acelea ale nămolurilor respective normale exprimate în activitate specifică $(\Delta E/c) \times 10^{-3}$

Proba	Conc. proteică mg/ml	pH = 2,9	pH = 4,4	pH = 7,4	pH = 8,1
Nămol normal inițial	1,36	46	110	23	36
24 ore					
Nămol normal	1,36	46	110	23	36
Nămol intoxicat	1,33	51	72	11	45
6 zile					
Nămol normal	2,41	33	91	—	81
Nămol intoxicat	3,12	18	130	—	19
20 zile					
Nămol normal	1,45	20	120	120	82
Nămol intoxicat	1,47	45	21	33	21

Această modificare majoră nu se reflectă însă în curbele de eluție pe Sephadex G-75. După 20 zile, modificările survenite la 24 ore și 6 zile, revin la normal, curba de eluție este total asemănătoare celei a proteinelor nămolului activ (fig. 4). Nu este exclusă nici posibilitatea ca modificările obținute după 24 ore și 6 zile să fie datorite tocmai variațiilor activităților enzimatice pentru ca inhibarea lor să readucă curbele de eluție la normal.

Activitatea proteazică a piscurilor obținute la gel-filtrarea pe Sephadex G-75

Prin trecerea pe o coloană de Sephadex a extractelor totale obținute din nămolurile active normale rezultă o purificare de trei ori a enzimelor proteolitice de pH = 2,9. De această dată însă, activitatea proteolitică nu este concentrată într-un singur pisc, ci este repartizată pe ambele grupe mari de piscuri (I și III), (tabelul 3).

Suma activităților piscurilor scade odată cu gradul de intoxicare. Se poate observa însă din tabelul 3 că dacă activitatea proteolitică a piscurilor II și III scade, odată cu gradul de intoxicare, la piscurile I activitatea proteolitică crește, la 24 ore intoxicare predominînd piscul I'.

Tabelul 3

Suma activităţilor proteolitice ale piscurilor proteice exprimate în activitate specifică (E/c) $\times 10^{-3}$

Proba	pH = 2,9			pH = 4,4			pH = 7,4			pH = 8,2		
	Piscul	$\Delta E/c$	Suma	Piscul	$\Delta E/c$	Suma	Piscul	$\Delta E/c$	Suma	Piscul	$\Delta E/c$	Suma
Nămol normal		46			110			23			36	70
	I	33	133	II	67	123	I	41	52		—	
	III	1000		III	56		II	11		III	70	
Nămol intoxicat		51			72			11			45	
24 ore	I	23		I	27		I	78		I′	82	141
	I′	41	134	I′	19	146	între	64	148	între	40	
	II	70		II	100		II	6		II	19	
Nămol intoxicat		18			130			—			19	93
6 zile	I	84	106	I	10	40		—	16		—	
	II	22		II	30		II	16		II	93	
Nămol intoxicat		45			21			33			21	
20 zile	I	42	62	I	1	31	I	3	59	I	7	52
	II	20		între	30		între	56		între	27	
										II	18	

La acest pH, pH = 2,9, se poate remarca la nămolul normal o activitate proteolitică crescută a piscului III a cărui componente au o greutate moleculară de aproximativ 5000. Rezultate asemănătoare au fost semnalate și de Turck pe țesut animal (9).

La pH = 4,4, prin trecerea pe o coloană de Sephadex G-75 a extractelor totale din nămolurile active nu mai rezultă o purificare a enzimelor proteolitice. La nămolul normal, întreaga activitate este concentrată în piscurile de greutate moleculară mică (II și III). Odată cu creșterea gradului de intoxicare apare o activitate redusă și în piscul I, majoritatea menținîndu-se pe piscul II. La acest pH dacă la 24 ore intoxicare se observă o ușoară creștere a sumei activităților proteolitice, la 6 zile și 20 zile intoxicare urmează o scădere puternică.

La pH = 7,4, trecerea pe o coloană de Sephadex G-75 a extractelor purifică enzimele de acest pH. Dacă activitatea proteolitică de acest pH la nămolul normal și cel intoxicat 24 ore este localizată în piscul I, la cel de 6 zile intoxicare este localizată în piscul II, iar la cel de 20 zile intoxicare este nulă în piscul II, fiind deosebit de scăzută în primul pisc.

Cu excepția unei activități proteolitice de pH = 4,4 la enzimele proteolitice localizate între piscurile proteice de la nămolul intoxicat 20 zile, la acest pH = 7,4, se remarcă o activitate deosebit de crescută la intoxicarea de 24 ore și cea de 20 zile.

La pH = 8,2, suma activităților cateptice a piscurilor obținute prin trecerea pe coloana de Sephadex G-75 urmează același aspect cu acela de la pH = 7, 4 : o creștere bruscă a activității la 24 ore intoxicare cu scăderea continuă pînă la 20 zile intoxicare. Spre deosebire de pH = 7,4 la acest pH activitatea este repartizată cu preponderență în piscurile II și III pentru o intoxicare îndelungată, pentru ca la 24 ore intoxicare activitatea crescută să fie datorită piscului I'.

Urmărind rezultatele de mai sus putem spune că activitățile enzimelor proteolitice, din nămolurile active, separate prin gel-filtrare suferă modificări dependente de gradul de intoxicare și de pH-ul la care sînt determinate.

Dacă la pH-uri acide, intoxicarea de 24 ore nu produce modificări mari, la pH-uri alcaline se constată o activare puternică. Această activare s-ar putea datora fie acțiunii de activator al intoxicantului pentru enzimele proteolitice de pH alcalin, fie modificărilor suferite de celule, modificări care se repercutează în eliberarea unor cantități mărite de enzime proteolitice. Cu cît gradul de intoxicare crește activitățile proteolitice scad la toate enzimele cu excepția enzimelor de pH alcalin care revin spre normal.

Deosebit de interesantă pare a fi preponderența activităților cateptice în piscurile proteice cu greutăți moleculare mici.

Deci se poate spune că : urmărind modificările induse de o intoxicare îndelungată se poate aprecia starea reală a unui nămol activ putînd trage concluzii în ceea ce privește continuarea stării de intoxicare sau puterea de regenerare a nămolului activ.

După cum se știe, starea de agregare a bacteriilor este factorul esențial în procesle biochimice ale nămolului activ (1). Unul din elementele de importanță majoră a stării de agregare sînt proteinele complexului manan-proteine al peretelui celular, fapt demonstrat de pierderea

agregării în urma tratamentului cu papaină sau tripsină (10, 11). S-a mai arătat că deflocularea de către tripsină sau papaină este ireversibilă (12). Rezultatele noastre care indică o modificare a activităţilor proteolitice ale bacteriilor în funcţie de starea de intoxicare pot fi conexe cu prezenţa enzimelor proteolitice în mediu şi cu efectul lor asupra stării de agregare. Creşterea activităţii proteolitice în extractele solubile pare să demonstreze labilitatea peretelui celular a unor bacterii din complexul de nămol activ în urma intoxicării, cu eliberarea unor proteaze în mediu. Aceasta ar putea fi unul din mecanismele care determină deflocularea în nămolurile active intoxicate.

Mulţumim dr. Lidia Vaicum şi A. Eminovici de la Institutul de cercetări, proiectări şi gospodărirea apelor pentru materialul furnizat şi pentru concursul acordat în elaborarea acestei lucrări.

Predat la redacţie la 20 decembrie 1976

Institutul de ştiinţe biologice
Colectivul de proteine

PROTEOLITIC ACTIVITIES OF SOLUBLE PROTEINS EXTRACTED FROM NORMAL AND p-NITRO-ANILINE INTOXICATED ACTIVE SLUDGES

SUMMARY

Normal and *p*-nitro-aniline intoxicated active sludges were tested in terms of their proteolitic activity at four pH's (two acid and two alkaline values). Total extracts, as well the peaks collected by Sephadex G-75 gel-filtration of these extracts were used in our investigation.

The alterations showed by the biologically active proteins (proteolytic enzymes) may be regarded as an index for the intoxication or regeneration state of an active sludge.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Atkinson, I. S. Daoud, *Advances in biochemical engineering*, vol. 4, ed. T. K. Ghose, A. Fiechter, N. Blakebrough, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, pg. 41.
2. J. Turkova, O. Mikes, K. Ganger, M. Bonblin, Biochem. Biophys. Acta, **178**, *100* (1969).
3. Z. Moldoveanu, E. Ilica, S. Rădulescu, St. cerc. biochim., **20** (1977).
4. L. Vaicum, A. Eminovici, Water Research, **8**, *1007* (1974).
5. F. Andrews, Biochem. J., **96**, *906* (1965).
6. L. A. Hanson, B. G. Johansson, *Nobel Symposium 3*, ed. Almqvist and Wiksell, Stockholm, 1967, pg. 141.
7. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
8. M. E. Press, R. Porter, J. Cebra, Biochem. J., **74**, *501* (1960).
9. V. Turk, *Intracellular protein metabolism*, May 1973, Halle Saale DDR, pg. 56.
10. A. A. Eddy, A. D. Rudin, Inst. Brew., *64*, 368, 1958.
11. S. O. Stanley, A. H. Rose, J. Gen. Microbiol., **48**, 9, 1967.
12. G. B. Calleja, J. Gen. Microbiol., **64**, 247, 1970.

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 39 — 43 (1977)

SPECIFICITATEA DE SPECIE A LEGĂRII IgG DE RECEPTORII Fc AI LIMFOCITELOR ŞI MACROFAGELOR

II. LEGAREA IgG MONOMERĂ DE LIMFOCITE ŞI MACROFAGE OMOLOGE ŞI ETEROLOGE

JABBAR-S-AHMED

Rezumat. — Folosind tehnica rozetelor ES s-a observat că IgG monomeră omologă nu se leagă de limfocite, în timp ce, un procent mic dar semnificativ de macrofage peritoneale de şoarece fixează IgG omologă. IgG eterologă se leagă atît de limfocite cît şi de macrofage. IgG de om a fost ataşată de 50% din limfocite de şoarece şi 80% din limfocitele de iepure şi porc, ceea ce sugerează că IgG s-a legat atît de limfocitele B cît şi de o parte din limfocitele T. IgG de şobolan este incapabilă de a se lega de limfocite şi macrofage, ceea ce arată că IgG de şobolan este lipsită de IgG citofilă. IgG citofilă reprezintă un procent mic (2 — 3%) din preparatele de IgG umană. Constanta relativă de afinitate pentru IgG de om a receptorilor Fc ai limfocitelor de la speciile testate a fost comparabilă, ceea ce demonstrează că structuri similare au fost implicate în legarea IgG umană.

Limfocitele şi macrofagele au capacitatea de a fixa IgG prin intermediul receptorilor lor Fc. Gheţie şi colab. (1) lucrînd pe un număr limitat de specii au sugerat că celulele ataşează mai bine IgG eterologă decît cea omologă.

Scopul acestei lucrări a fost de a confirma datele lor şi de a le extinde la alte specii.

MATERIAL ŞI METODE

Limfocite. Suspensii celulare din spline de şoarece (AKR), iepure (Chinchilla), şobolan (Wistar) şi porc, s-au amestecat cu metrizoat de sodiu-Ficoll, densitate 1,077. S-a efectuat o centrifugare în gradient la 200 g, timp de 20 de minute. Celulele s-au spălat de 3 ori în mediu IC—65 (Institutul „I. Cantacuzino", Bucureşti). Viabilitatea s-a determinat prin metoda cu albastru de tripan. În majoritatea cazurilor viabilitatea celulelor a fost peste 85%.

Macrofage. S-au injectat şoareci (AKR) cu mediu Brewer cu tioglicolat (Difco, USA) (2). După 4 zile de la inoculare intraperitoneală s-a recoltat lichidul intraperitoneal prin spălări repetate a cavităţii cu mediul IC-65 rece. Viabilitatea celulelor a fost întotdeauna mai mare de 90% iar puritatea de 80%.

Îmbrăcarea eritrocitelor de oaie cu proteina A din S. aureus. Eritrocitele de oaie au fost îmbrăcate cu proteina A (SpA) după o tehnică descrisă anterior de Gheţie şi colab. (3). 0,25 ml eritrocite de oaie centrifugate s-au suspendat în 0,75 ml tampon veronal salin (pH 7,2) şi s-a adăugat 0,5 ml soluţie salină de SpA (2,5 mg). Peste amestecul format s-a adăugat treptat, sub agitare magnetică, 5 ml dintr-o soluţie de clorură cromică ($CrCl_3$) 0,5 mM. Amestecul final s-a incubat la 30°C pentru o oră într-un termostat Höppler şi apoi celulele s-au spălat cu tampon veronal salin de 3 ori prin centrifugare. Final, celulele s-au suspendat la o concentraţie de 10^9 eritrocite/ml în mediu IC—65 conţinînd azidă de sodiu 1 mg/ml. Eritrocitele îmbrăcate cu SpA (ES) au fost păstrate la 4°C şi utilizate în experimente timp de cel mult 7 zile.

Preparatele de IgG. IgG de om, iepure, şobolan şi porc au fost preparate prin precipitare cu sulfat de amoniu şi cromatografie pe DEAE-celuloză. IgG de şoarece s-a preparat prin electroforeză preparativă pe gel de agaroză (4).

Toate preparatele de IgG s-au testat pentru puritate prin imunoelectroforeză folosind antiseruri specifice.

Tratarea celulelor cu IgG și măsurarea constantei relative de afinitate. Celulele (limfocite 5×10^6, macrofage 3×10^6) au fost suspendate în 0,5 ml de mediu IC-65 conținînd cantități diferite de IgG (0,06 — 4 mg%10^7 celule) pentru măsurarea constantei de afinitate și pentru determinarea procentului de celule cu IgG legat. După incubare în ghiață, timp de 45 de minute, celulele au fost spălate de 2 ori cu mediu IC-65 la rece, conținînd azidă de sodiu 1 mg/ml. Depozitul celular spălat a fost resuspendat la concentrația celulară dorită.

Formarea rozetelor. La 0,5 ml de celule tratate și netratate cu IgG conținînd 10^6 celule s-a adăugat 0,05 ml de reactiv ES, conținînd 5×10^7 eritrocite. Amestecul a fost centrifugat la 4°C, pentru 10 minute (300 g) și a fost incubat la 4°C, pentru o oră. Depozitul a fost resuspendat prin pipetare și s-a adăugat 0,2 ml dintr-o soluție de formaldehidă 2% în tampon fosfat salin (TFS). După 10 minute s-a adăugat 0,2 ml dintr-o soluție de albastru de toluidină 0,2 % în TFS. Au fost numărate la microscop mai mult de 200 de celule rozetate sau nerozetate. Celulele cu mai mult de trei eritrocite pe suprafața lor au fost considerate rozetate. Toate experimentele au fost executate în duplicat.

Absorbția IgG-ului uman pe limfocite. Preparatele de IgG umană au fost absorbite succesiv cu limfocite (1 mg IgG/4 $\times$ 10^7 ml) conducînd după 4 absorbții la un preparat de IgG lipsit de capacitatea de a se lega de limfocite splenice de șoarece. Cantitatea IgG-ului citofil din preparatele IgG-ului uman a fost determinată prin diferența dintre concentrația inițială și cea finală a proteinei.

REZULTATE

Legarea IgG-ului provenit de la diferite specii de limfocite splenice și macrofage peritoneale de șoarece. IgG de la diferite specii s-a legat de limfocitele splenice (tabelul 1). S-a observat că IgG-ul omolog a fost incapabil de a se lega de limfocite, în timp ce, macrofagele au format un procent mic dar semnificativ de rozete ES. IgG-ul eterolog s-a legat de un procent mai ridicat de limfocite și macrofage.

Tabelul 1

Legarea IgG-ului omolog și eterolog de limfocitele splenice și macrofagele peritoneale de șoarece [1]

Celule[2]	Procent de rozete ES după tratare cu IgG[3]				
	Om	Iepure	Porc	Șobolan	Șoarece
Limfocite	50,0 ± 0,2	41,4 ± 2,1	27,1 ± 1,5	NR[4]	NR
Macrofage	64,3 ± 7,7	50,8 ± 4,3	40,2 ± 1,7	NR	15,0 ± 4,2

[1] Media a 2 — 3 experimente

[2] Toate valorile au fost corectate prin scăderea procentului de rozete ES formate cu celulele netratate cu IgG

[3] Concentrația de IgG : 2 mg/ml/10^7 celule

[4] NR = celulele n-au format un procent semnificativ de rozete ES.

Limfocitele au reacționat cu diferite IgG în următoarea ordine : om (50%), iepure (41%) și porc (27%). La macrofage ordinea a fost aceeași : om (64%), iepure (51%) și porc (40%). Receptorii Fc ai limfocitelor de șoarece au arătat o afinitate similară pentru IgG de iepure și porc (1,5 — 2,8) însă mai ridicată pentru om (3,9) (tabelul 2).

Macrofagele peritoneale de șoarece au o afinitate mare pentru IgG de om (6,6), dar mai scăzută pentru IgG de iepure și porc (2,1 — 2,3).

Tabelul 2

Constanta relativă de afinitate a receptorilor Fc ai limfocitelor splenice și macrofagelor peritoneale de șoarece

Celule	Constanta relativă de afinitate pentru IgG de :				
	Om	Iepure	Porc	Șobolan	Șoarece
Limfocite	3,9	1,5	2,8	NR[1]	NR
Macrofage	6,6	2,3	2,1	NR	1,6

[1]) NR = celulele n-au format un procent semnificativ de rozete ES, de aceea nu s-a putut determina constanta lor de afinitate.

Legarea IgG-ului uman de limfocitele de la diferite specii. Limfocitele de șoarece, șobolan, iepure și porc au fost tratate cu IgG de om. Din rezultatele obținute (fig. 1) se observă că un procent asemănător de limfocite de iepure și porc leagă IgG de om (80%), în timp ce, aproximativ 50% din limfocitele de șobolan, respectiv de șoarece, au fixat IgG-ul uman.

Constanta relativă de afinitate a receptorilor Fc ai limfocitelor pentru IgG-ul uman a fost asemănătoare pentru iepure, șobolan și porc (2,0), însă semnificativ mai ridicată în cazul limfocitelor de șoarece (3,9).

IgG-ul citofil în preparatul IgG-ului uman. Preparatul de IgG uman a fost absorbit succesiv cu limfocite de șoarece conducînd după 4 absorbții la un preparat de IgG lipsit de capacitatea de a se lega de limfocite splenice

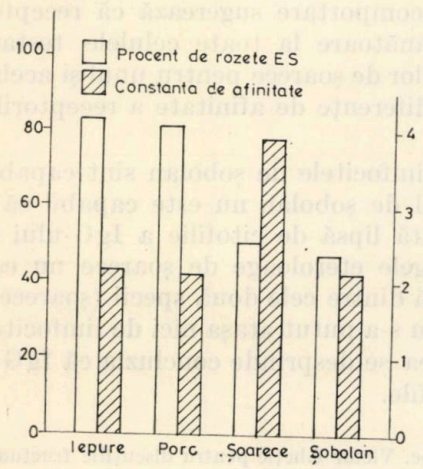


Fig. 1. — Procentul de legare al IgG-ului uman și constanta relativă de afinitate a limfocitelor splenice de la speciile testate.

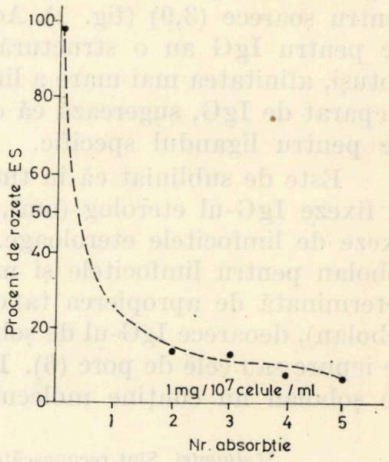


Fig. 2. — Absorbția succesivă a IgG-ului uman cu limfocitele splenice de șoarece.

de șoarece. Cantitatea de IgG din preparatele IgG-ului uman (aproximativ 2 — 3%) sugerează că doar o mică parte din IgG-ul uman este citofil pentru limfocitele de șoarece (fig. 2).

DISCUȚII

Gheție și colab. (1) utilizînd tehnica ES au arătat că IgG eterolog se leagă de limfocite și macrofage însă cel omolog este incapabil de a se lega de aceste celule. Rezultatele obținute de noi sugerează că 50% din limfocitele de șoarece și 80% din limfocitele de iepure și porc au fixat IgG de om. Luînd în considerare că procentul de limfocite B este de 30 — 35%, se pare că IgG-ul uman s-a legat atît de limficitele B cît și de o parte din limfocitele T. Pe de altă parte limfocitele de șoarece au fixat un procent de IgG de iepure și porc asemănător cu procentul de limfocite B prezent în splina de șoarece, ceea ce ar însemna că numai celulele B sînt implicate în legarea IgG de iepure și porc.

S-a observat că afinitatea receptorilor Fc ai limfocitelor splenice și macrofagelor peritoneale de șoarece este mai mare pentru IgG de om decît pentru IgG de iepure și porc. Această comportare poate fi explicată prin conținutul mai mare de IgG citofil în preparatele de IgG umană.

Procentul IgG-ului citofil în preparatele de IgG umană este de 2 — 3% (fig. 2) valoare care este mai mare decît procentul de IgG citofil de iepure (maximum 1 %) găsit de Sorkin (5).

Limfocitele splenice de șoarece, șobolan, iepure și porc au fost tratate cu IgG de om. S-a observat că 80% din limfocitele de iepure și porc fixează IgG de om, în timp ce, legarea IgG-ului de limfocitele de șoarece și șobolan este mai redusă (47 — 50%). Constanta relativă de afinitate a limfocitelor purtătoare de receptori Fc pentru IgG-ul uman a fost similară la șobolan și iepure și porc (aproximativ 2,0), dar semnificativ mai ridicat pentru șoarece (3,9) (fig. 1). Această comportare sugerează că receptori Fc pentru IgG au o structură asemănătoare la toate celulele testate. Totuși, afinitatea mai mare a limfocitelor de șoarece pentru unul și același preparat de IgG, sugerează că există diferențe de afinitate a receptorilor Fc pentru ligandul specific.

Este de subliniat că în timp ce limfocitele de șobolan sînt capabile să fixeze IgG-ul eterolog (om), IgG-ul de șobolan nu este capabil să se fixeze de limfocitele eteroloage. Această lipsă de citofilie a IgG-ului de șobolan pentru limfocitele și macrofagele eteroloage de șoarece nu este determinată de apropierea taxonomică dintre cele două specii (șoarece—șobolan), deoarece IgG-ul de șobolan nu s-a putut atașa nici de limfocitele de iepure sau cele de porc (6). De aceea se desprinde concluzia că IgG-ul de șobolan nu conține molecule citofile.

Mulțumiri. Sînt recunoscător dr. doc. Victor Gheție pentru discuțiile fructuoase purtate în cursul acestei lucrări.
De asemenea am plăcerea să adresez mulțumirile mele colegilor mei dr. A. Sulica, Maria Gherman, Mariana Laky, ca și as. med. Mariana Feher.

Prezentat la redacție la 15 dec. 1976

Laboratorul de imunologie
Institutul „V. Babeș”,
București

SPECIES SPECIFICITY OF IgG BINDING TO Fc RECEPTORS OF LYMPHOCYTES AND MACROPHAGES. II. MONOMER IgG BINDING TO HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS LYMPHOCYTES AND MACROPHAGES

SUMMARY

Making use of the ES rozette tehnique it was observed that monomer homologous IgG does not bind to lymphocytes, while a low but significant percentage of peritoneal mouse macropahages fixed homologous IgG. Heterologous IgG binds to lymphocytes as well as to macrophages.

Human IgG attached to 50% of mouse lymphocytes and 80% of rabbit and pig lymphocytes. This suggests that human IgG binds to *B*-lymphocytes as well as to *T*-lymphocytes.

Rat IgG was unable to bind to lymphocytes and to macrophages ; this shows that rat IgG lacks cytophilia.

The cytophilic IgG represents only a small part of human IgG preparation (2 — 3%).

The relative affinity constant of *Fc* receptors of lymphocytes from tested species for human IgG was comparable. This suggests that structurally related *Fc* receptors sites for human IgG are present on the surfaces of tested species.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Gheţie, I. Moraru, A. Sulica, Maria Gherman, J. Sjöquist, Rev. roum. Biochim., *13*, 263, 1976.
2. A. E. Stuart, J. A. Habershaw and A. E. Davinson, *Handbook of Experimental Immunology* (ed. Weir D. M.), vol. 2, pg. 241, 1973.
3. V. Gheţie, K. Nilsson, J. Sjöquist, Eur. J. Immunol., *4*, 500, 1974.
4. V. Gheţie, D. Grigoraş-Moţet, St. cercet. Biochim., *5*, 409, 1962.
5. S. v. Boyden, E. Sorkin, *Immunology 3*, 272, 1960.
6. Jabbar-S-Ahmed, Rev. roum. Biochim., *13*, 277, 1976.

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 45 — 49 (1977)

ASPECTE ALE TRANSPORTULUI ACTIV MITOCONDRIAL

CORNELIA MIHAI, MIHAIL ŞERBAN

Rezumat. — S-au studiat cîteva tipuri de umflare energetică ale mitocondriilor în diverse condiţii experimentale : iradiere, radiosensibilizare cu oleilamină, prezenţa tumorii, în tumoră şi în anaerobioză. În acest scop s-au urmărit următoarele umflări energetice :
a) — umflarea endogenă ;
b) — umflarea în prezenţa succinatului ;
c)— Umflarea în prezenţa ATP.
Rezultatele arată că radiosensibilizarea, prezenţa tumorii, tumora sau menţinerea în anaerobioză determină alterări ale capacităţii mitocondriilor de a se umfla activ.
In cercetări anterioare s-au pus în evidenţă unele alterări ale metabolismului mitocondrial în condiţiile iradierii şi radiosensibilizării (1). Acestea au demonstrat scăderea capacităţii de a efectua un transport cuplat cu reacţiile biochimice mitocondriale.
De asemenea, în condiţiile prezenţei tumorii în organism, sau în mitocondriile tumorale se produc schimbări care duc la un transport ineficient în aceste condiţii (2). În condiţiile anaerobiozei, deşi mai slabe ca în mitocondriile tumorale, se observă alterări ale cuplării mecanochimice (3).
Scopul lucrării de faţă este de a reuni cîteva experimente de transport activ prin membrana mitocondrială în condiţiile radiosensibilizării, a prezenţei tumorii şi în mitocondriile tumorale, ca şi în condiţiile menţinerii în anaerobioză.

MATERIAL ŞI METODĂ

Animale. S-au folosit şobolanii Wistar comuni 100 — 110 g. Animalele care s-au iradiat au primit total doza de 800 R, 180 KVP, 15 mA, filtru 0,5 Cu, iar sacrificarea s-a făcut după 3 şi 5 zile. Tumora ascitică Guérin T_8 a fost transplantată prin inoculare i.p. (5×10^6 celule). Animalele au fost sacrificate după 10 — 15 zile de la inoculare ; fluidul ascitic a fost aspirat din abdomen, iar ficatul a fost recolat şi prelucrat în aceleaşi condiţii ca şi ficatul de la şobolanii martor, în vederea preparării mitocondriilor.

Mitocondriile de ficat s-au preparat prin metoda Hogeboom şi col. (4), iar cele tumorale după Utsumi (5), metode utilizate şi în (2).

Oleilamina s-a preparat şi injectat conform lui (1).

Anaerobioza. Mitocondriile au fost barbotate 15 minute cu azot ; altele au stat 15 minute la temperatura camerei.

Proteina s-a dozat prin metoda Folin (6).

Determinarea umflării mitocondriilor. Umflarea energetică s-a urmărit după Blondin (7) şi (2).

Pentru detalii experimentale vezi legenda figurilor.

Rezultatele sînt media a minimum 5 preparate mitocondriale ; toate determinările s-au făcut în probe duble.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Umflarea energetică în mitocondriile radiosensibilizate. Acetatul de potasiu (KAc) induce o umflare rapidă ; pentru acest tip de umflare este necesară energia rezultată din transferul de electroni sau din hidroliza

ATP(7). În determinările noastre mediul a fost energetizat atît prin utilizarea surselor de energie endogene, cît şi a celor exogene; ca surse exogene s-au folosit ATP sau succinat. Rezultatele (fig. 1*A*) arată că în cazul folosirii sursei endogene de energie apare o mică scădere a umflării numai după 5 zile şi aceasta la toate mitocondriile tratate.

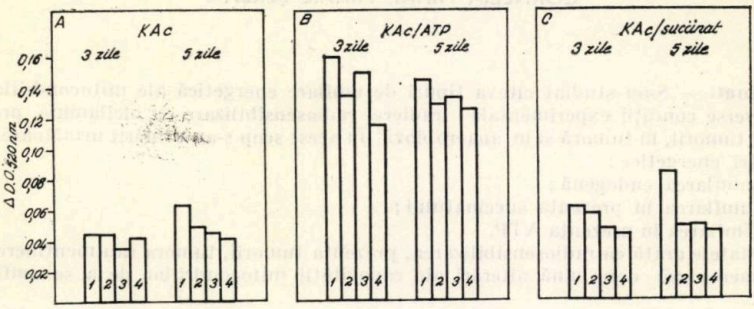


Fig. 1. — Influenţa OA.HCl, a iradierii şi a radiosensibilizării asupra umflării energetice în KAc 0,15 M.

1 — Martor; *2* — OA.HCl; *3* — 800 R; *4* — 800 R + OA HCl. Mitocondriile (1mg/25 µl) s-au adăugat unui mediu de KAc 0,15 M conţinînd 30 µmoli Tris-acid citric, pH 7.4. La determinarea umflării în prezenţa unor surse exogene de energie, mediul a mai conţinut ATP (2,5 µ moli) sau acid succinic (15 µ moli); volum final 3 ml (7).

La folosirea ATP ca sursă de energie (fig. 1*B*) se observă o diferenţiere între umflarea mitocondriilor iradiate şi radiosensibilizate, acestea din urmă caractrizîndu-se printr-o umflare energetică mai redusă; după 5 zile, umflarea scade şi în cazul mitocondriilor iradiate.

Utilizarea succinatului (fig. 1*C*) duce de asemenea la o scădere a umflării energetice, mai accentuată după 5 zile, dar nu se observă modificări între mitocondriile iradiate şi radiosensibilizate.

Umflarea energetică a mitocondriilor de purtător şi tumorale. Figura 2*A* ilustrează comportarea mitocondriilor în KAc energetizat prin substrat endogen. Se observă o dependenţă de pH a răspunsului mitocondrial. Deşi există diferenţe nete în comportarea celor trei categorii de mitocondrii, se constată că umflarea mitocondriilor de ficat normal prezintă la pH 6 — 6,7 valori de acelaşi ordin de mărime cu cele de ascită aflate în condiţii optime (pH 7,4); s-ar părea deci, că răspunsul prin umflare ar fi o funcţie de pH şi de cantitatea de substrat endogen.

Este tentant să se presupună că scăderea pH-ului intracelular, asociată cu reducerea cantităţii de substrat endogen, situaţie posibilă în cursul comutării metabolismului aerob la metabolism glicolitic, să constituie unul din factorii care contribuie la scăderea reactivităţii unor mitocondrii normale în celule aflate în curs de tranziţie.

Cum mitocondriile normale prezintă capacitatea cea mai mare de a efectua umflare energetică în prezenţa substratului endogen, s-a pus problema dacă diferenţele de umflare observate între cele 3 categorii de mitocondrii nu se datoresc numai unor factori de ordin cantitativ, ci şi calitativi. În acest scop mediul a fost suplimentat cu succinat (fig. 2*B*)

și ATP (fig. 2*C*); se observă însă că diferențele dintre cele trei categorii de preparate se mențin. Mitocondriile de ascită sînt practic incapabile să efectueze umflare energetică, iar cele de purtător prezintă o umflare mult mai mică decît cele normale. Faptul că nici în prezența unui exces de substrat diferențele dintre preparate nu dispar, reflectă probabil o deficiență a mecanismelor de transport. Cauza ar putea fi modificările structurale ale membranelor mitocondriale, sau unei inactivări ale sistemelor transportoare de substrat.

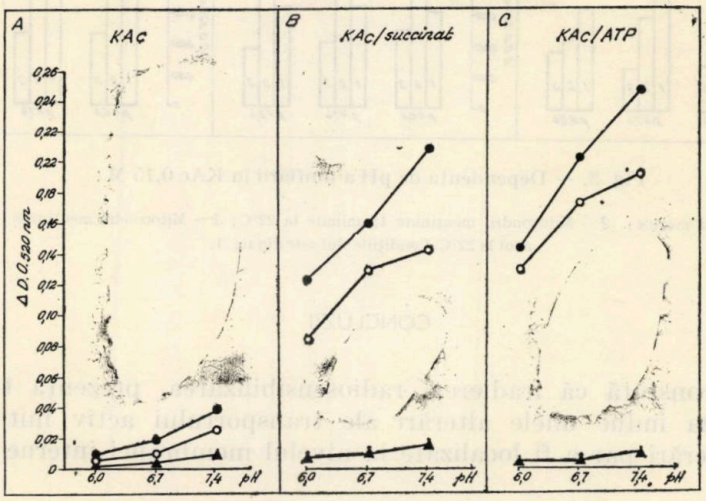


Fig. 2. — Dependența de pH a umflării în KAc 0,15 M.

●–● Mitocondrii de ficat normal: o–o Mitocondrii din ficatul gazdei;
▲–▲ Mitocondrii de tumoră ascitică. Condițiile sînt cele din fig. 1.

Mitocondriile normale răspund la variația de pH de la acid la fiziologic cu o creștere liniară a umflării energetice; spre deosebire de acestea mitocondriile de purtător prezintă o creștere neuniformă, în sensul că activarea umflării de la pH 6,7 la 7,4 este mai mică decît între pH 6 și 6,7. Această comportare sugerează că mitocondriile normale ar fi capabile de a regla mai fin utilizarea resurselor de energie în funcție de pH, capacitate care este mai slabă la mitocondriile de purtător și dispare la cele tumorale.

Umflarea energetică în anaerobioză. Figura 3*A* ilustrează comportarea mitocondriilor în KAc energetizat prin substrat endogen; se observă o dependență de pH a răspunsului mitocondrial. Menținerea 15 minute la 22°C, dar mai ales anaerobioza, induce un răspuns mai slab la acest tip de umflare în KAc izoton. Și aici, se pare, că răspunsul prin umflare este o funcție de pH și de cantitatea de substrat endogen.

Cînd mediul a fost suplimentat cu succinat (fig. 3*B*) și ATP (fig. 3*C*), se observă că diferențele dintre cele trei preparate nu se mai mențin în cazul succinatului, dar se mențin la energetizarea cu ATP. Preparatele menținute 15 minute la 22°C dovedesc o activare a umflării cu succinat față de martor, iar cele menținute în anaerobioză demonstrează o inhibare a proce-

sului de umflare cu succinat. Cînd energetizarea s-a făcut cu ATP la toate cele trei pH-uri se observă o scădere a umflării la preparatele menţinute 15 minute la 22°C şi mai ales la cele în care s-a barbotat azot, fenomenul fiind mai pregnant la pH 8,4.

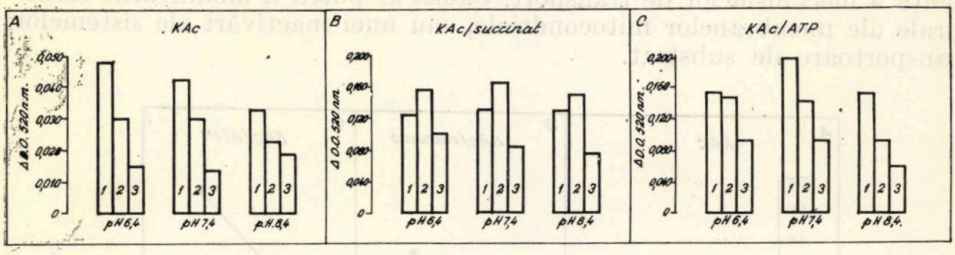


Fig. 3. — Dependenţa de pH a umflării în KAc 0,15 M:

1 - Mitocondrii martor; *2* — Mitocondrii menţinute 15 minute la 22°C; *3* — Mitocondrii menţinute 15 minute sub azot la 22°C. Condiţiile sînt cele din fig. 1.

CONCLUZII

Se constată că iradierea, radiosensibilizarea, prezenţa tumorii şi anaerobioza induc unele alterări ale transportului activ mitocondrial. Aceste alterări par a fi localizate la nivelul membranei interne mitocondriale.

Răspunsul prin umflare fiind unul din mecanismele cibernetice prin care mitocondria îşi controlează metabolismul, pare importantă alterarea indusă de factorii studiaţi.

Este de menţionat că în cazul iradierii, radiosensibilizării şi a cancerului aceste alterări par a fi ireversibile ducînd la alterări funcţionale şi structurale ale mitocondriilor. Nu se ştie dacă aceste alterări au repercusiuni ireversibile şi asupra celulei întregi.

În orice caz, transportul activ alterat pare a fi răspunzător de o cuplare alterată a reacţiilor biochimice mitocondriale.

Prezentat la redacţie 22 dec. 1976

Institutul Oncologic Bucureşti

ASPECTS OF THE ACTIVE MITOCHONDRIAL TRANSPORT

SUMMARY

Several kinds of energetized swelling of the mitochondria in some experimental conditions were studied: irradiation, radiosensitization with oleylamine, presence of tumour, in the tumour and in the anaero-

biosis. For this purpose the following energetized swelling was determined :

a) endogenous swelling ;
b) swelling in the presence of succinate ;
c) swelling in the presence of ATP.

Our results suggest that the radiosensitization, the presence of the tumour, the tumour or the maintenance in anaerobiosis determine some alterations of the mitochondrial capacity to swell actively.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Dinescu, C. Mihai, Rev. Roum. Biochim., **10**, *23* (1973).
2. G. Dinescu-Romalo, C. Mihai, A. Popescu, Rev. Roum. Biochim., **11**, *233* (1974).
3. C. Mihai, G. Dinescu-Romalo, Rev. Roum. Biochim., sub tipar.
4. G. Hogeboom, W. Schneider, G. Palade, J. Biol. Chem., **172**, *619* (1948).
5. K. Utsumi, G. Yamamoto, K. Inaba — Biochim. Biophys. Acta, **105**, *368* (1965).
6. V. Gheţie, V. Micuşan, *Analiza imunochimică*, Ed. Academiei, Bucureşti, p. 140.
7. G. Blondin, D. E. Green, Arch. Biochem. Biophys., **132**, *509* (1969).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 51 — 53 (1977)

METODĂ DE EXTRACŢIE A PROTEINELOR SOLUBILE DIN NĂMOLURILE ACTIVE

ZINA MOLDOVEANU, ECATERINA ILICA, SANDA RĂDULESCU

Rezumat. — Se prezintă o metodă de dezintegrare ultrasonică a microorganismelor din nămolurile active folosite în instalaţiile de epurare biologică a apelor reziduale.

Caracterizarea din punct de vedere biochimic a unui nămol activ se poate face prin studiul proprietăţilor proteinelor extrase din nămol.

Printre metodele de extracţie a proteinelor adesea se foloseşte extracţia în moara coloidală (1), metodă care implică mai multe etape succesive de lucru cu un randament scăzut în concentraţie proteică.

În această lucrare ne-am propus să găsim o metodă mai simplă care să dea şi o cantitate mărită de proteine. În acest scop am ales metoda de dezintegrare ultrasonică întrebuinţată de obicei pentru sfărîmarea membranei plasmatice în vederea obţinerii formaţiunilor subcelulare din drojdii sau fungi (2) (3).

METODA

10 ml de suspensie nămol activ se centrifughează la 6000 rpm timp de 20 min. Depozitul cîntărit se reia într-un volum de tampon TRIS—HCl 0,02M, NaCl 0,2M, pH = 8 cu 2% DOC, astfel încît să se realizeze o concentraţie de 0,1 g/ml. Suspensia se ultrasonează de 4 ori, cîte 1 min., la rece, la o amplitudine de 8 microni, şi se centrifughează apoi timp de 20 min la 10000 rpm. Supernatantul reprezintă extractul proteic ultrasonat. Ultrasonarea s-a făcut cu un dezintegrator ultrasonic M. S. E 100 watt.

Concentraţiile proteice s-au determinat prin metoda Lowry (4).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În vederea stabilirii eficienţei metodei de ultrasonare propuse s-a comparat această metodă cu metoda de extracţie în moara coloidală. Astfel în tabelul 1 sînt date comparativ metodele : la moara coloidală, prima extracţie (A), care a fost urmată de extracţii repetate (*B*) şi ultrasonare (*C*). Depozitul consecutiv etapei 7 (centrifugare) a fost examinat microscopic comparativ cu depozitul ultrasonat de la etapa 2. La depozitul iniţial s-au observat microorganisme vii bine conturate, unele în mişcare. La depozitul ultrasonat, microorganismele sînt imobile, nu mai prezintă contururi celulare ci multe aglomerări de resturi celulare.

Randamentele celor două tipuri de extracţie prezentate în tabelul 2 conduc la următoarea observaţie : randamentul extracţiei prin ultrasonare este dublu (1,36%) faţă de cel al extracţiei prin moara coloidală

Tabelul 1

Extracţia proteinelor

	A	*B*	*C*
1. Suspensie	—	—	10 ml
2. Depozit	5g	5g	0,4g
3, Reluat în tampon	10 ml	10 ml	4ml
4. Moară cu 2% DOC	da	da	—
5. Îngheţare	da	da	—
6. Ultrasonare cu 2% DOC	—	—	da
7. Centrifugare	da	da	da
8. Concentraţia proteică a extractului	3,8mg/ml	—	1,36 mg/ml
9. Repetarea extracţiei de la punctul 4 de 3 ori	—	da	—
10. Concentraţia proteică a extractelor unite	—	1,6mg/ml	—

(0,76 %). Repetarea extracţiei în moara coloidală încă de trei ori reuşeşte să mai extragă o cantitate de proteine (0,96%), care împreună cu prima extracţie dă un randament aproximativ egal cu acela de la extracţia prin ultrasonare.

Tabelul 2

Randamentele metodelor din tabelul 1

Metoda	Conc. proteică /ml	Vol. ml	Conc. proteică /vol.	Material iniţial în mg	Prot. în 1 g material	Randament	Total
A	3,8 mg	10	38 mg	5 000	7,6	0,76	1,72
B	1,6 mg	30	48 mg	5 000	9,6	0,96	
C	1,36 mg	4	5,44 mg	400	13,6		

Deşi cantitatea de proteine obţinută este mică (randamentul de 1,36%) aceasta nu este o consecinţă a metodei folosite ci se datoreşte cantităţii mici de proteine solubile din microorganisme.

CONCLUZII

Reiese că metoda de dezintegrare ultrasonică se poate folosi mai uşor decît metoda de extracţie în moara coloidală, atît datorită simplităţii

ei cît și randamentului mărit (1,36% față de 0,76%), în scopul extracției proteinelor solubile din nămolurile active.

Prezentat la redacție la 30 decembrie 1976

Institutul de științe biologice
Colectivul de biochimie

A METHOD OF SOLUBLE PROTEIN EXTRACTION FROM ACTIVE SLUDGES

SUMMARY

A method is reported for the ultrasound disintegration of microorganisms in active sludges used for the waste water biological epuration.

BIBLIOGRAFIE

1. L. Vaicum, A. Eminovici, Water Research, **8**, *1007* (1974).
2. H. D. Slade, K. J. Vetter, J. Bacteriol., **71**, *236* (1956).
3. G. Bosco, J. Infectious Diseases, **99**, *270* (1956).
4. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem., **193**, *265* (1951).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 55 — 58 (1977)

IZOLAREA LIMFOCITELOR UMANE PRIN CENTRIFUGARE ÎN GRADIENT DE POLIVINILPIROLIDONĂ-ODISTON

I. MORARU, A. C. BANCU, A. SULICĂ, LUCREŢIA CIUCĂ

Rezumat. — Limfocitele din sîngele periferic uman au fost izolate prin centrifugare în gradient de densitate folosind un nou amestec dens, mai accesibil, din polivinilpirolidonă şi Odiston. Au fost analizaţi parametrii optimi ai metodei de separare pentru a stabili o tehnică standard. Metoda poate fi aplicată la cantităţi diferite de sînge şi poate servi şi la separarea celulelor vii de cele moarte.

Cu rare excepţii experimentele efectuate pe limfocite necesită populaţii pure, ceea ce implică o etapă iniţială de izolare şi purificare a lor. Tehnica cea mai utilizată în acest scop constă în centrifugarea sîngelui pe un gradient de Ficoll-Isopaque (Triosil, Hypaque etc.). În timpul centrifugării hematiile, polimorfonucleare şi monocitele sedimentează prin amestecul dens iar limfocitele rămîn la interfaţă. Această tehnică a fost descrisă iniţial de Boyum (1) şi este larg folosită cu modificări minore (2), (3). Scopul acestei lucrări a fost de a adapta această metodă condiţiilor oricărui laborator prin folosirea unor materiale uşor accesibile.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit: polivinilpirolidonă (PVP) cu greutatea moleculară 25 000 (Fluka sau Serva), Odiston 60 sau 75 (Uzina de Medicamente Bucureşti), heparină fiole cu soluţie 5000 UI/ml (Biofarm), Marisang (Uzina de Medicamente Bucureşti), mediu de cultură IC 65 sau soluţie Hanks' (Institutul Cantacuzino).

Sîngele uman a fost obţinut de la Centrul de Hematologie Bucureşti, recoltat pe conservant şi a fost prelucrat în aceeaşi zi în maximum 2 ore de la recoltare.

Centrifugările au fost executate într-o centrifugă cu răcire K—23 Janetzki cu rotor basculant (swing out), folosind tuburi cu fund rotund sau conic (100/16 mm), la temperatura de 4°C. Numărătorile de celule s-au executat în camere Bürker-Türck, testele de viabilitate s-au făcut cu o soluţie de eosină 0,5%, iar puritatea a fost determinată pe frotiuri colorate cu soluţie Giemsa. Determinarea densităţii soluţiilor s-a făcut picnometric.

Tehnica de separare 1. Într-un tub de centrifugă cu fundul rotund se introduc 4 ml amestec dens de separare preparat extemporaneu sau păstrat în frigider bine închis şi la adăpost de lumină. De regulă acest amestec a avut densitatea 1,081 şi consta în 20 ml Odiston 60, 80ml PVP soluţie 10% şi 0,2 ml soluţie de heparină, sau 16,2 ml Odiston 75, 83,6 ml PVP soluţie 10% şi 0,2 ml heparină.

2. Se aplică cu grijă pentru a nu amesteca lichidele, 3 — 8ml sînge ca atare sau diluat 2 : 1 sau 1 : 1 cu Marisang heparinat cu 50 UI/ml.

3. Centrifugare 15 min la 2000 rpm (754 xg).

4. Se îndepărtează stratul superior de plasmă prin aspirare cu o pipetă Pasteur ataşată la o trompă de vid.

5. Se recoltează banda de limfocite cu o pipetă Pasteur iar lichidul recoltat (cca 2ml) se trece într-o eprubetă de centrifugă cu fundul conic. Se adaugă un volum de 4 — 5 ori mai

mare mediu IC 65 sau soluție Hanks' care conțin heparină 50 UI/ml și se omogenizează cît mai bine.

6. Centrifugare 10 min la 1700 rpm (540 xg).
7. Sedimentul se resuspendă în mediu heparinat.
8. Centrifugare 10 min la 1100 — 1200 rpm (230 — 270 xg).
9. Resuspendare finală în mediu fără heparină.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru a stabili condițiile optime de izolare s-au analizat următorii parametri ai tehnicii :

1. *Concentrația soluției de PVP:* s-a dovedit optimă concentrația de 10%. Valorile mai mari împiedică sedimentarea hematiilor în timp ce concentrațiile prea mici nu realizează un prag convenabil de vîscozitate la interfață.

2. *Concentrația de Odiston:* variind proporția de Odiston /PVP se obțin amestecuri de separare cu densități diferite (fig. 1). Reducerea densității sub 1,07 g/ml nu mai permite formarea benzii de limfocite la interfață

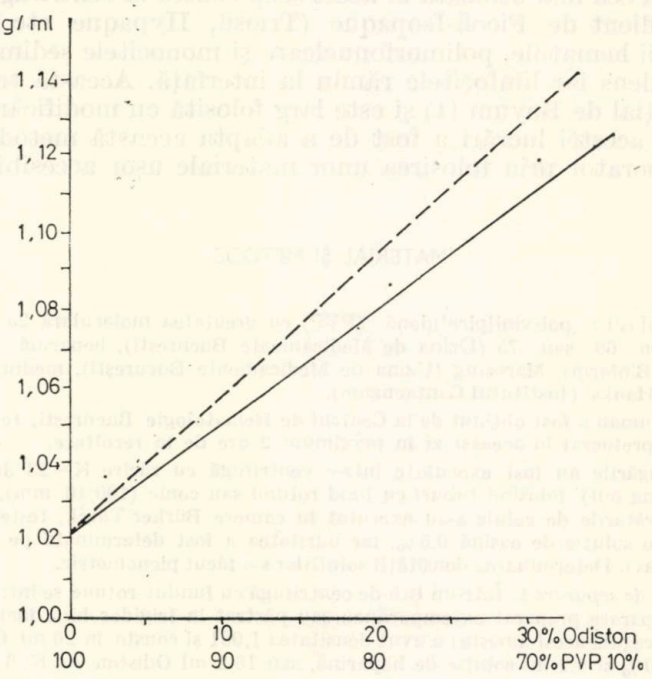


Fig.1 Densitatea amestecurilor PVP-Odiston 60 (—) și PVP-Odiston 75 (— —)

în timp ce densitățile de peste 1,10 g/ml nu mai separă limfocitele de restul elementelor albe iar la valori de peste 1,115 g/ml leucocitele nu mai pot fi separate de hematii. În intervalul 1,07 — 1,10 g/ml odată cu creșterea

densității crește și randamentul izolării limfocitelor dar scade puritatea populației limfocitare obținute. În funcție de scopul urmărit, randament sau puritate, sînt convenabile valori ale densității cuprinse între 1,077 și 1,091 g/ml, densitatea folosită în mod obișnuit fiind 1,081 g/ml.

3. *Condițiile de centrifugare:* forța centrifugală aplicată și timpul de centrifugare sînt parametri critici condiționînd randamentul izolării, iar utilizarea rotorului basculant este esențială. (tab. I)

Tabelul I

Separarea celulelor albe în diferite condiții de centrifugare pe amestec cu densitatea 1,091

Nr. crt.	Forța centrifugală	Timpul de centrifugare min.	Leucocite recuperate %
1	188 xg 1 000 rpm	40	35,2
2	1 180 xg 2 500 rpm	30	26,5
3	2 310 xg 3 500 rpm	30	14,3
4	3 020 xg 4 000 rpm	15	28,3

Fiecare valoare reprezintă media a patru probe.

Randament bun și o puritate convenabilă a populației de limfocite izolate au fost obținute la următoarele forțe centrifugale și timpi de centrifugare în funcție de densitatea amestecului folosit : 10 min, 2000 rpm (754 xg) pentru densitatea 1,077 g/ml, 15 min 2000 rpm pentru 1,081 g/ml, 20 min 2000 rpm pentru 1,084 g/ml, 20 min, 2500 rpm pentru 1,087 g/ml, 25 min 2500 rpm pentru 1,091 g/ml.

4. *Amestecul de separat:* aplicarea sîngelui ca atare pe gradient s-a dovedit nesatisfăcătoare datorită fluxului mare de hematii care pot antrena limfocitele prin suprafața de separare. Izolarea a fost realizată în condiții mai bune folosind sînge diluat în proporție de 2 :1 sau 1 :1 cu Marisang. Diluarea în continuare a sîngelui nu constituie un avantaj reducînd prea mult numărul de limfocite în bandă.

5. *Spălarea celulelor izolate:* datorită faptului că la recoltarea benzii se aspiră inerent și o cantitate de amestec de separare, sedimentarea ulterioară a celulelor în condiții de centrifugare blîndă devine imposibilă. Acesta este motivul pentru care lichidul recoltat se diluează cu un volum cît mai mare de mediu și apoi se centrifugă la forțe centrifugale mari.

În condițiile tehnicii prezentate mai sus s-au obținut populații de limfocite relativ pure. În suspensia finală au fost prezente 15 — 30% hematii și 70 — 85% leucocite din care 1 — 3% monocite, 1 — 3% polimorfonucleare și peste 95% limfocite. Randamentul izolării limfocitelor s-a situat în jurul valorii de 75% (20 — 25% din numărul inițial de leucocite) (tab. II). Viabilitatea celulelor izolate a depășit întotdeauna 90% de regulă fiind de 98 — 100%. Tehnica de izolare așa cum a fost prezentată mai sus poate fi folosită și pentru separarea celulelor vii dintr-o populație limfocitară cu viabilitatea redusă. Celulele moarte fiind permeabile sedimentează prin amestecul dens, în timp ce celulele vii rămîn la interfață. Prin acest procedeu s-au obținut populații cu viabilitatea de 95% pornind de la suspensii cu 30 — 40% celule vii.

Rezultatele obținute prin tehnica descrisă sunt comparabile cu cele raportate pentru tehnica cu Ficoll-Isopaque (sau Hypaque, Triosil, etc.)

Tabelul II

Izolarea limfocitelor în condiţiile tehnicii uzuale în probe paralele

Nr. crt.	Numărul iniţial de limfocite	Numărul de limfocite recuperate	Randament %
1. a	$8,55 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$	81
b	$8,55 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$	63
2. a	$10,3 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	94
b	$10,3 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	59
3. a	$2,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	97
b	$2,9 \times 10^6$	2.2×10^6	76

prin care s-au realizat recuperări ale limfocitelor în proporţie de 20 — 90% (2) (3). Dispersia mare a rezultatelor privind randamentul şi puritatea poate fi explicată prin faptul că limfocitele sînt distribuite în diferite clase de densitate între 1,05 şi 1,11 g/ml, majoritatea fiind grupate între 1,06 şi 1,08 g/ml, cu o predominanţă a celulelor *B* în subpopulaţiile uşoare şi a celulelor *T* în cele dense (4) (5). Se poate ca alegerea unei densităţi necorespunzătoare să ducă la eliminarea unor subpopulaţii de limfocite şi îmbogăţirea relativă cu alte subpopulaţii. Acesta este motivul pentru care am preferat utilizarea densităţii de 1,081 g/ml în locul celei utilizate curent 1,077 g/ml.

În concluzie, tehnica descrisă prezintă toate avantajele tehnicilor de izolare a limfocitelor prin centrifugare în gradient de densitate : rapiditate, reproductibilitate, puritate, fiind datorită noului mediu de separare folosit, mai economică şi deci mai accesibilă.

Laboratorul de Imunologie
Institutul Victor Babeş, Bucureşti

Primit la redacţie la 4 decembrie 1976

PURIFICATION OF HUMAN LYMPHOCYTES BY GRADIENT CENTRIFUGATION ON A POLYVINYLPYRRHOLIDON — ODISTON MIXTURE.

SUMMARY

The peripheral blood lymphocytes could be purified by density gradient centrifugation using a new mixture of PVP and Odiston for cell separation. The optimal conditions for isolation and purification have been analysed for a standard labor technique.

BIBLIOGRAFIE

1. Boyun A., Scan. J. Clin. Lab. Invest. *21*, suppl. 31, 1968.
2. Harris R., Ukajiofo E. O., Brit. J. Haematol., *18*, 229, 1970.
3. Perper R. J., Zee T. W., Mickelson M. M., J. Lab. Clin. Med., *73*, 842, 1968.
4. Haskill J. S., Legge D. G., Shortman K., J. Immunol., *102*, 703, 1969.
5. Shortman K., J. Cell. Physiol. *77*, 319, 1971.

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 59 — 61 (1977)

IZOLAREA SUBCLASEI IgA_1 DIN COLOSTRU UMAN

GABRIELA MOŢA

Rezumat. — Imunoglobulina A secretoare obţinută din colostru uman a fost supusă unui tratament de disociere a legăturilor de hidrogen prin incubare cu dodecilsulfat de sodiu (SDS) 1%, guanidină-HCl 4M sau uree 6M. Separarea subclasei s-IgA_1 de dimerii de lanţ greu şi uşor proveniţi din disocierea subclasei s-IgA_2, s-a făcut prin gel-filtrare sau electroforeză preparativă în poliacrilamidă în mediu disociant. S-au utilizat trei metode de extracţie a proteinei din gel. Subclasa s-IgA_1 s-a obţinut în condiţii satisfăcătoare numai prin electroforeză preparativă urmată de electrodializă. Preparatul obţinut poate fi utilizat la prepararea serurilor monospecifice anti-subclase de IgA.

Pentru separarea celor două subclase de IgA secretoare umană (s-IgA), s-a pornit de la ideea că alcătuirea diferită a celor două populaţii de molecule, şi anume asamblarea prin legături disulfidice interlanţ α_1 — L în cazul subclasei IgA_1 şi prin legături de hidrogen α_2 — L în cazul subclasei IgA_2 (1) (2) (3) (4) (5) (6), poate să confere proprietăţi diferite celor două populaţii de molecule. Pe baza acestor proprietăţi s-a căutat să se elimine în procent cît mai ridicat, una dintre subclase. Astfel s-a utilizat hidroliza selectivă cu acţiune preferenţială asupra subclasei s-IgA_1 pentru izolarea subclasei s-IgA_2 (7), iar pentru separarea subclasei s-IgA_1 s-a căutat să se disocieze legăturile de hidrogen α_2 — L ale subclasei s-IgA_2, care să fie eliminată din preparat sub formă de dimeri de lanţ greu şi uşor, pe baza diferenţei de greutate moleculară.

MATERIAL ŞI METODE

IgA secretoare s-a obţinut din colostru uman prin precipitare cu sulfat de amoniu 40% urmată de gel-filtrare pe Sephadex G-200 240 × 4 cm. Pentru disocierea legăturilor de hidrogen, preparatele au fost incubate iniţial cu dodecilsulfat de sodiu (SDS) 1 %, guanidină-HCl 4M sau uree-6M în tampon TRIS-HCl 0,1N, NaCl 0,2 M pH 8,0, timp de 2 la 20 ore, la 24 şi 37°C.

Separarea fracţiunilor pe bază de greutate moleculară s-a făcut prin gel-filtrare pe o coloană de Sephadex G—200 120 × 2,5 cm echilibrată în tamponul de incubare, sau prin electroforeză în poliacrilamidă (PAA) (8) 6% în tampon TRIS—HCl 0,075M, glicocol 0,065M pH 8,7 cu SDS 0,1 %, guanidină-HCl 4M sau uree-6M. Electroforeza în PAA s-a utilizat atît în scop preparativ cît şi pentru aprecierea cantitativă a subclaselor. În primul caz s-au folosit plăci cu grosimea gelului 3 mm şi în al doilea caz grosimea gelului a fost de 1,5 mm iar timpul de migrare 210 minute, la o intensitate a curentului electric de 1,5 mA/cm. Pentru extragerea din PAA a s-IgA nedisociate, s-a folosit îngheţarea şi desgheţarea succesivă a gelului urmată de centrifugare la 15 000 rpm, ca şi trecerea electroforetică a proteinei din gelul de PAA în gel de agaroză 1%, timpul de migrare a fost de 150 minute iar intensitatea curentului electric 1 mA/cm. Extragerea s-a făcut şi prin electrodializă. S-a utilizat un tub în „U" (fig. 1) cu diametrul de 1 cm şi cu o extremitate detaşabilă avînd lungimea de 2 cm, care reprezintă camera de extracţie unde proteina migrează din gel în tampon. Camera de extracţie s-a închis la un capăt cu sac de dializă Visking pe care s-a aplicat gelul de PAA în care s-au inclus fragmentele de gel conţinînd proteine, iar deasupra s-a adăugat tampon

borat 0,3M pH 8,0 și s-a închis cu sac de dializă. Camera de extracție s-a pus în continuare în legătură cu tubul „U" conținînd același tampon, cu ajutorul unui manșon de cauciuc iar cele două extremități ale tubului s-au introdus în cuva de electroforeză. S-a aplicat un curent electric de 5 mA/cm² cu polul negativ la camera de extracție și timpul de migrare 10 ore. Proteina migrată în tamponul camerei de extracție s-a concentrat prin ultrafiltrare (filtru Diaflo PM_{10}).

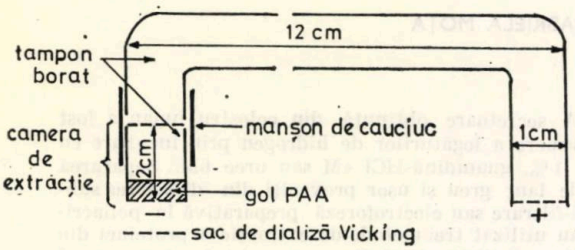


Fig. 1 — Instalație de electrodializă.

IgA secretoare extrasă a fost dializată față de tampon TRIS-HCl 0,1M pH 8,0, apoi analizată imunoelectroforetic și prin gel-filtrare pe o coloană de Sephadex G-200 120 × × 1cm echilibrată în același tampon. Prezența subclaselor de s-IgA a fost testată prin electroforeză în PAA conținînd SDS 0,1%; preparatele au fost incubate inițial cu SDS 1%, 20 ore la 37°C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

IgA secretoare a fost supusă unui tratament de rupere a legăturilor de hidrogen existente între lanțurile grele și ușoare ale subclasei IgA_2, prin incubare cu SDS 1%. În continuare s-IgA nedisociată (subclasa IgA_1) a fost izolată prin gel-filtrare pe Sephadex G-200 sau prin electroforeză preparativă. La gel-filtrare s-au obținut trei piscuri (fig. 2) care au fost analizate prin electroforeză în PAA cu SDS 0,1% (fig. 3). Martorul (*a*), s-IgA incubată cu SDS 1% fără gel-filtrare, prezintă o bandă la start caracteristică s-IgA_1 nedisociate precum și linii pentru lanțurile provenite din disocierea s-IgA_2; primul pisc cromatografic (*b*) care conține un procent ridicat de s-IgA_1 contaminat cu lanțuri, nu mai are imaginea tipică a benzii de la start; în continuare (*c*) reprezintă lanțurile 2 și (*d*) lanțurile L. După dializa piscului I (s-IgA_1) pentru înlăturarea SDS, s-a testat imunoelectroforetic; s-a obținut o linie de precipitare foarte dispersată și deplasată, indicînd alterare moleculară, în concordanță cu imaginea obținută la electroforeza în PAA.

În continuare s-a trecut la o tehnică mai rapidă, electroforeza preparativă în gel de PAA, care să dea posibilitatea unei acțiuni cît mai scurte a factorului disociant asupra moleculei de s-IgA. Ca factor disociant s-a utilizat SDS 1%, guanidină-HCl 4M și uree-6M, s-au testat timpii de incubare între 2 și 20 ore și temperaturi de 24 și 37°C. S-a stabilit că pentru electroforeza preparativă s-IgA se incubează inițial cu factorul disociant 2 ore la 24°C, iar pentru analiza subclaselor preparatele se incubează 20 ore la 37°C.

IgA_1 secretoare extrasă din gelul de PAA prin cele trei procedee descrise, a fost analizată imunoelectroforetic, ca și pentru prezența subclaselor prin electroforeză în PAA cu SDS. Imaginea imunoelectroforetică este modificată pentru preparatele extrase prin înghețare ca și pentru cele trecute pe agaroză și apoi extrase. Doar prin electrodializă s-a obținut

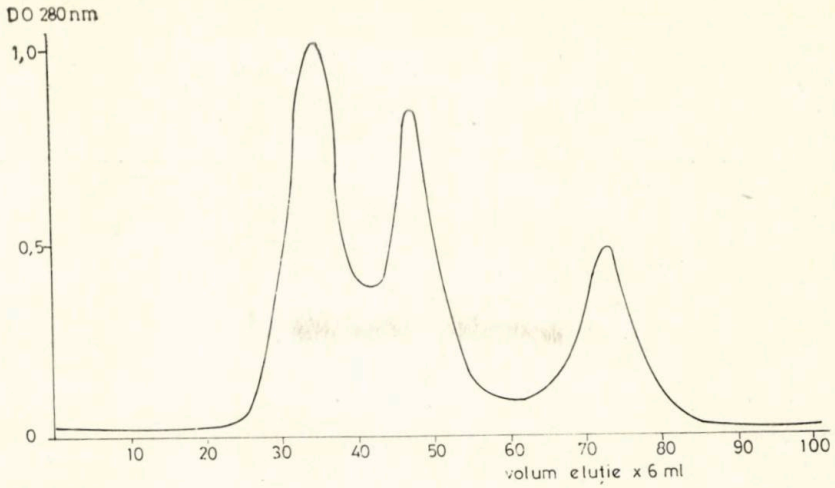


Fig. 2 — Gel-filtrare s-IgA pe Sephadex G-200 în SDS 4 %.

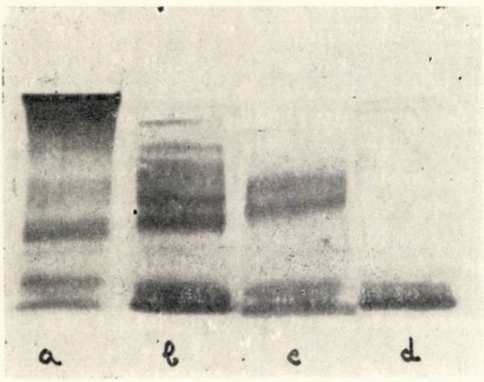


Fig. 3 — Electroforeza în PAA 6 % cu SDS 0,1 % a s-IgA inițială (*a*) și a fracțiunilor obținute prin gel-filtrare în SDS 1 % : (*b*) pisc I, (*c*) pisc II, (*d*) pisc III.

Fig. 4 — Imunoelectroforeza s-IgA inițială (*b*) și a s-IgA_1 (*a*) obținută prin electroforeză preparativă în PAA cu SDS urmată de electrodializă.

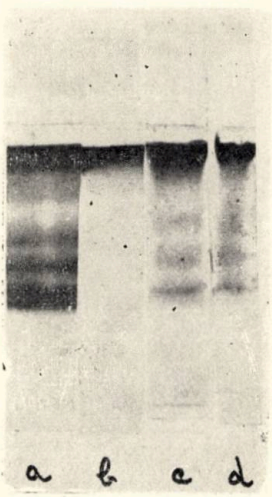


Fig. 5 — Electroforeză în PAA cu SDS a s-IgA inițială (*a*) și a s-IgA obținută prin electroforeză preparativă în PAA 6 % cu SDS 0,1 % (*b*), guanidină-HCl 4M (*c*) și uree 6M (*d*).

un preparat de s-IgA$_1$ (fig. 4*a*) cu o imagine apropiată de a s-IgA inițiale (fig. 4*b*). La electroforeza în PAA pentru testarea prezenței subclaselor în preparatele prelucrate în mediu cu SDS, guanidină-HCl sau uree, s-a pus în evidență o singură bandă la start ce reprezintă s-IgA$_1$ numai la probele prelucrate în SDS, la cele prelucrate în uree și guanidină-HCl apar și linii ale lanțurilor provenite din disocierea IgA$_2$ ce impurifică preparatele (fig. 5). Un randament bun s-a obținut numai la extracția prin electrodializă, prin celelalte procedee s-a obținut un procent foarte mic de s-IgA.

IgA$_1$ secretoare obținută prin electroforeză preparativă în PAA cu SDS și extrasă din gel prin electrodializă, a fost trecută pe o coloană de Sephadex G-200 și a avut același volum de eluție cu volumul s-IgA inițiale.

În concluzie, ținînd seama că prin electroforeza în PAA cu SDS puritatea subclaselor de s-IgA se poate aprecia cu o eroare de 5% (7), se poate afirma că s-a obținut un preparat de s-IgA$_1$ cu o puritate în jur de 95% capabil să reacționeze cu antiserurile specifice anti-IgA și avînd o greutate moleculară nemodificată. Acest preparat poate fi utilizat la obținerea antiserurilor specifice anti-subclase de IgA.

Aduc mulțumiri pe această cale colegei mele Mariana Caralicea pentru excelenta asistență tehnică acordată.

Prezentat la: 16 octombrie 1976

Institutul Victor Babeș București

IGA$_1$ SUBCLASS ISOLATION FROM HUMAN COLOSTRUM

SUMMARY

The secretory immunoglobulin A obtained from human colostrum was submitted to a dissociation treatment of the hydrogen links by incubation in 1% sodiumdodecylsulphate, 4M guanidine-HCl or 6M urea. Separation of the s-IgA$_1$ subclass from the heavy and light chains dimers resulting from dissociation of s-IgA$_2$ subclass, was performed by gel-filtration or preparative electrophoresis in polyacrylamide gel made in dissociating medium.

Three extracting methods were used to get out the protein from the gel. The IgA$_1$ subclass has been obtained in satisfactory conditions only by means of preparative electrophoresis followed by electrodialysis.

The IgA$_1$ preparation may be used to obtain monospecific anti-subclasses IgA sera.

BIBLIOGRAFIE

1. W. D. Terry, M. S. Roberts, Science, *153*. 1007 (1966).
2. A. Feinstein, E. C. Franklin, Nature (Lond), *212*, 1496 (1966).
3. H. M. Grey, C. A. Abel, W. Y. Yount, H. G. Kunkel, J. Exp. Med., *128*, 1223 (1968).
4. C. A. Abel, H. M. Grey, Nature New Biology (Lond), *233*, 29 (1971).
5. G. N. Wyes, H. H. Fudenberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *64*, 1211 (1969).
6. L. N. Jerry, H. G. Kunkel, H. M. Grey, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, *65*, 557 (1970).
7. G. Moța, Rev. roum. Biochim. (1976) (sub tipar).
8. R. H. Maurer, Disk-Electrophoresis (ed. Walter de Gruyer), Berlin (1968).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 63 – 69 (1977)

CERCETĂRI PRIVIND UTILIZAREA PIGMENŢILOR CAROTENOIDICI.

III. EFECTUL ULEIULUI DIN FRUCTE DE *HYPPOPHAË RHAMNOIDES* ASUPRA PIGMENTAŢIEI GĂLBENUŞULUI DE OU

GAVRIL NEAMŢU+, GHEORGHE SĂLĂJAN°, TIBERIU LÁSZLO+, CORINA BILAUS+ şi KENNETH L. SIMPSON*

Rezumat. — Uleiul obţinut din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides*, adăugat în proporţie de 0,5 şi 1 % în hrana găinilor din rasa Leghorn, sănătoase şi bolnave de micoplasmoză, intensifică pigmentaţia grăsimii corpului din ţesuturile subcutanate, a gălbenuşelor ouălor şi măreşte valoarea biologică a unor produse alimentare avicole.
Absorbţia şi depozitarea carotenoidelor se face în mod selectiv, fiind mai intensă în cazul xantofilelor cu structură α– şi β-iononică (luteină, zeaxantină criptoxantină, izocriptoxantină) şi mai puţin intensă în cazul carotenoidelor hidrocarburice (α, β, γ-carotina, Neo-β-carotina) şi al celor epoxidice (eloxantina, violaxantina).
Uleiul din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* reprezintă un material bun pentru a fi utilizat în hrana păsărilor, ca sursă de pigmenţi carotenoidici.

În cadrul cercetărilor privind utilizarea pigmenţilor carotenoidici, s-a studiat efectul uleiului din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* asupra pigmentaţiei şi îmbunătăţirii valorii biologice a unor produse alimentare avicole.

Uleiul din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* are un conţinut ridicat în pigmenţi carotenoidici, predominînd xantofilele cu structură α- şi β-iononică, care sînt uşor absorbite de găini din hrană şi depozitate în gălbenuşele ouălor. Alături de carotenoide, în ulei se găsesc vitamine liposolubile, acizi graşi superiori, uleiuri eterice, glicozide, alcaloizi etc. (1, 2, 3), substanţe care, introduse în hrana păsărilor, influenţează funcţionarea organismului acestora.

Întrucît uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* este bogat în pigmenţi carotenoidici şi conţine numeroase alte substanţe active, am considerat utilă experimentarea sa în scopuri curative, pentru vindecarea unor afecţiuni la organismele animale.

În această lucrare se prezintă pigmenţii carotenoidici din furajul combinat de bază, din uleiul fructelor de *Hyppophaë rhamnoides* şi din gălbenuşele ouălor provenite de la găini sănătoase şi bolnave de micoplasmoză, în hrana cărora s-a adăugat ulei din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides*, în diferite concentraţii. Rezultatele se prezintă comparativ faţă de proba martor.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe găini din rasa Leghorn, în vîrstă de 21 săptămîni, repartizate în 4 loturi, de cîte 21 de găini în fiecare lot. Toate loturile de găini au primit acelaşi furaj combinat de bază. Lotul I, format din găini sănătoase, a servit ca lot martor. La cele-

lalte loturi de găini s-a adăugat în hrana de bază ulei din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides*, în proporție de 0,5 % pentru lotul II, 0,5 % pentru lotul III și 1 % pentru lotul IV. Lotul II a fost format din găini sănătoase, lotul III din găini bolnave de micoplasmoză, cu ușoare tulburări digestive, iar lotul IV a fost format din găini bolnave de micoplasmoză, cu tulburări digestive accentuate.

Furajarea găinilor cu hrană diferențiată pentru cele 4 loturi a durat 90 de zile (din 5.II.1976 pînă în 5.V.1976). Experiența a fost precedată de o perioadă preexperimentală de trei săptămîni, timp în care găinile s-au obișnuit în loturi, au primit același furaj (diferit de furajul combinat de bază dat găinilor în peroada experienței) și s-au eliminat indivizii necorespunzători.

Hrana administrată găinilor în perioada experienței se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Structura furajului dat găinilor în timpul experienței exprimat în procente (%)

Denumirea produselor din furajul combinat de bază	Lotul de găini			
	I	II	III	IV
Făină de porumb	67,5	67,00	67,00	66,5
Șroturi de floarea soarelui	13,00	13,00	13,00	13,00
Șroturi de soia	6,00	6,00	6,00	6,00
Făină de pene de viscere	2,00	2,00	2,00	2,00
Făină de pește	2,00	2,00	2,00	2,00
Ulei de fructe de *Hyppophaë rhamnoides*	—	0,5	0,5	1,00
Cretă furajeră	6,20	6,20	6,20	6,20
Făină de oase	2,00	2,00	2,00	2,00
Sare de bucătărie	0,30	0,30	0,30	0,30
Zoofort	1,00	1,00	100	1,00

Găinile au fost ținute în padocuri închise, asigurîndu-se condiții optime de hrană, apă, microclimat și igienă.

Uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* s-a extras cu acetonă, în aparatul Soxhlet, folosindu-se făină din fructe coapte și uscate.

Extractul primar s-a concentrat ulterior pentru îndepărtarea totală a acetonei.

Conținutul pigmenților carotenoidici din furajul combinat de bază și din uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Conținutul pigmenților carotenoidici în furajul combinat de bază și în uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* în μg/g

Carotenoide	Furaj combinat de bază	Ulei din fructe de *Hyppophaë rhamnoides*
1. α-Carotină	0,86	2,18
2. β-Carotină	2,64	96,45
3. Neo-β-carotină	—	16,61
4. δ-Carotină	—	22,45
5. γ-Carotină	—	56,90
6. α-Criptoxantină	0,76	—
7. Izocriptoxantină	—	14,82
8. β-Criptoxantină	1,64	162,89
9. Luteină	5,12	54,81
10. Zeaxantină	3,78	80,38
11. Licopină	—	14,65
12. Flavoxantină	—	8,29
13. Eloxantină	0,46	—
14. Violaxantină	0,50	15,76
Total carotenoide	15,76	545,99

Analiza pigmenților carotenoidici din gălbenușele ouălor s-a făcut din 5 în 5 zile în decursul experienței și a continuat încă 10 zile (pînă în 14.V.1976) după încetarea hrănirii găinilor cu furaj diferențiat, pentru a se stabili timpul de remanență a pigmenților carotenoidici în ouă.

Determinarea vitaminei A s-a făcut după P. Budowski și A. Bondi (4) și s-a exprimat în unități internaționale per gram (UI/g).

Extragerea, separarea, purificarea, identificarea și dozarea pigmenților carotenoidici din materialele analizate s-au făcut prin aceleași metode ca și în lucrările anterioare (5 — 10).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul total al pigmenților carotenoidici din gălbenușele ouălor, provenite de la cele 4 loturi de găini se prezintă în tabela 3.

Tabela 3

Conținutul total al pigmenților carotenoidici din gălbenușele ouălor, exprimat în μg/g

Data analizei	Numărul de zile de la începerea furajării păsărilor	Lotul de găini: I	II	III	IV
5.II.1976	0	29,15	30,87	32,34	31,91
10.II.1976	5	34,84	31,91	36,77	36,10
15.II.1976	10	44,82	37,17	38,17	45,55
20.II.1976	15	41,90	39,92	29,48	29,93
25.II.1976	20	33,19	29,44	30,69	36,16
2.III.1976	25	34,79	30,44	31,50	31,65
7.III.1976	30	21,55	28,96	27,44	43,26
12.III.1976	35	29,48	28,43	29,93	29,15
17.III.1976	40	23,95	27,29	32,40	31,16
22.III.1976	45	22,94	30,40	31,01	32,23
27.III.1976	50	28,04	32,40	37,46	32,07
1.IV.1976	55	24,10	38,22	36,73	41,07
5.IV.1976	60	25,74	29,92	29,20	36,51
10.IV.1976	65	23,79	27,60	27,05	33,85
15.IV.1976	70	22,32	26,19	28,86	33,64
20.IV.1976	75	19,07	28,51	25,74	27,09
25.IV.1976	80	23,72	28,83	26,82	28,39
30.IV.1976	85	28,18	29,70	27,27	33,78
5.V.1976	90	22,99	35,88	29,12	34,98
10.V.1976	95	26,99	30,12	29,18	28,84
14.V.1976	100	20,97	25,89	25,74	21,11
Total		582,52	647,52	642,90	698,43
Media μg/g		27,72	30,83	30,61	33,26

Uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides*, adăugat în procente mici în hrana găinilor sănătoase și bolnave de micoplasmoză, are un efect pozitiv asupra pigmentației gălbenușului de ou. Nu s-au semnalat deosebiri semnificative între conținutul pigmenților carotenoidici din gălbenușele ouălor loturilor II și III, ceea ce denotă că găinile bolnave de micoplasmoză absorb și depozitează în ouă pigmenții carotenoidici, la fel ca și găinile sănătoase. După aproximativ o lună de zile de la începerea experienței, găinile din loturile III și IV nu au mai prezentat tulburări digestive, ceea ce înseamnă că, probabil, uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* are efecte curative în asemenea afecțiuni. Conținutul relativ mai ridicat

al pigmenților carotenoidici din gălbenușele ouălor lotului IV, față de loturile II și III, se datorește procentului mai mare de ulei adăugat în hrana găinilor din acest lot.

Cantitatea maximă de pigmenți carotenoidici se acumulează în gălbenușe după 10 — 15 zile de la începerea experienței. După această perioadă conținutul carotenoidelor din ouă suferă oscilații sub aspect cantitativ, la toate loturile de găini. În coajă și în albușul ouălor nu se produce acumularea și depozitarea carotenoidelor.

Pigmenții carotenoidici din gălbenușele ouălor se prezintă, pe loturi, în tabela 4.

Tabela 4

Felul și conținutul pigmenților caroteno'dici din gălbenușele ouălor, în μg/g ulei

Carotenoide	Ouă provenite de la loturile de găini			
	I	II	III	
α-Carotină	0,16	0,28	0,15	0,28
β-Carotină	0,94	1,97	1,17	1,62
Neo-β-Carotină	0,22	0,39	0,29	0,32
γ-Carotină	—	0,26	urme	0,34
α-Criptoxantină	0,27	0,33	0,25	0,28
Izocriptoxantină	—	0,40	0,41	0,65
β-Criptoxantină	0,54	2,66	1,01	2,56
Luteină	6,82	6,46	6,11	7,68
Zeaxantină	4,99	6,98	6,43	8,27
Eloxantină	0,21	0,10	0,18	0,32
Flavoxantină	—	—	—	—
Violaxantină	0,28	0,22	0,17	0,25
Total carotenoide	14,43	20,05	16,17	22,57

Absorbția și depozitarea pigmenților carotenoidici în ouă se face în mod selectiv, în funcție de structura lor moleculară. Sînt mai ușor absorbite și depozitate în ouă xantofilele cu structură α- și β-iononică (luteina, zeaxantina, criptoxantina, izocriptoxantina), și mai greu carotenoidele hidrocarburice (α-carotina, β-carotina, Neo-β-carotina, γ-carotina) și cele epoxidice (eloxantina, violaxantina). Nu s-au identificat în ouă δ-carotina, licopina și flavoxantina, pigmenți ce se găsesc în uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides*. Pigmenții principali din ouă sînt luteina și zeaxantina, care în gălbenușele ouălor din loturile II și III se găsesc în cantități foarte apropiate. În gălbenușele ouălor din lotul I predomină luteina, iar la celelalte loturi zeaxantina. Gălbenușele ouălor din loturile II — IV au o culoare galben-portocalie mai intensă decît cele din lotul martor, fapt ce se datorește raportului supraunitar dintre conținutul pigmenților carotenoidici portocalii (β-carotina, Neo-β-carotina, γ-carotina, β-criptoxantina, zeaxantina), față de cei de culoare galbenă (α-carotina, α-criptoxantina, izocriptoxantina, luteina, eloxantina, violaxantina).

După terminarea furajării diferențiate a găinilor, pe loturi, s-au sacrificat cîte două găini din fiecare lot, pentru determinarea pigmenților

carotenoidici totali din pielea pi...
codiță, precum și pentru determinarea β-caro...be), grăsimea corpului, și din gălbenușele ouălor. Rezultatele se prezintă în tabe... A din ficat

Tabela 5

Conținutul total al pigmenților carotenoidici din pielea picioarelor, grăsimea corpului și codiță, a β-carotinei din ficat și a vitaminei A din ficat și din gălbenușele ouălor

Materialul analizat	Produsul determinat	Unitatea de măsură	Lotul de găini: I	II	III	IV
Pielea picioarelor	Caroteno de totale	µg/g	7,95	15,64	13,97	20,35
Grăsimea corpului	Carotenoide totale	µg/g	0,88	3,63	2,62	2,93
Codiță	Carotenoide totale	µg/g	0,50	0,53	0,96	1,43
Ficat	β-carotină	mg/100 g	3,60	6,05	5,35	5,85
Ficat	Vitamină A	UI/g	22,21	52,62	39,18	47,70
Gălbenușe ouă	Vitamină A	UI/g	2,78	7,54	11,64	12,06

Conținutul pigmenților carotenoidici totali, al β-carotinei și al vitaminei A din materialele analizate este mai mare la loturile II — IV față de lotul I, ceea ce înseamnă că uleiul din fructe de *Hyppophaë rhamnoides*, introdus în hrana găinilor, influențează pozitiv nu numai pigmentația gălbenușelor, dar și pigmentația corpului și creșterea conținutului vitaminei A din unele produse alimentare avicole, mărindu-le astfel valoarea biologică. Găinile din loturile III și IV au un conținut mai scăzut de β-carotină și vitamină A în ficat decît găinile sănătoase din lotul II. La fel se întîmplă și cu pigmenții carotenoidici totali din grăsimea corpului și, parțial, din pielea picioarelor. Deosebirile nu sînt însă prea mari și nu au o semnificație deosebită. Ele se datoresc, probabil, faptului că găinile din aceste loturi au avut tulburări digestive timp de o lună de zile și, în perioada respectivă, au absorbit într-o proporție mai mică pigmenții carotenoidici din hrană.

Creșterea conținutului vitaminei A în ficatul și în gălbenușele ouălor din loturile II — IV, față de lotul martor, se datorește faptului că pigmenții carotenoidici provitaminici absorbiți în hrană (β-carotina, α-carotina, α-criptoxantina, β-criptoxantina) au fost transformați parțial, în corpul găinilor, în vitamină A.

Prin utilizarea uleiului din fructe de *Hyppophaë rhamnoides* ca adaos în hrana găinilor s-ar putea reduce cantitatea din unele produse alimentare (făină de porumb, făină de grîu etc.) folosite în prezent în complexele de creștere a găinilor, ca surse de pigmenți carotenoidici.

CONCLUZII

Cercetările efectuate cu găini sănătoase și bolnave de micoplasmoză, în hrana cărora s-a adăugat 0,5 și 1% ulei din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides*, arată că uleiul utilizat intensifică pigmentația corpului, a gălbenușelor ouălor și mărește valoarea biologică a unor produse alimentare avicole, prin creșterea conținutului acestora în vitamină A.

Absorbția și depozitarea carotenoidelor se face în mod selectiv, în funcție de structura lor moleculară, fiind mai intensă în cazul carotenoidelor mono- și dihidroxilice și mai puțin intensă în cazul carotenoidelor hidrocarburice și al celor epoxidice.

Pigmenții carotenoidici provitaminici absorbiți din hrană se transformă parțial, în corpul găinilor, în vitamină A.

Pe baza cercetărilor efectuate se recomandă utilizarea uleiului din fructe coapte de *Hyppophaë rhamnoides* ca adaos în hrana găinilor, pentru intensificarea pigmentației corpului, a gălbenușelor ouălor, îmbunătățirii valorii biologice a unor produse alimentare avicole și pentru înlocuirea parțială a unor produse alimentare folosite în prezent, în crescătoriile de păsări, ca surse de pigmenți carotenoidici.

MENȚIUNI

Lucrarea s-a efectuat în cadrul programului internațional comun de cercetări în domeniul pigmenților carotenoidici încheiat între Consiliul Național pentru Știință și Tehnologie (România) și National Science Foundation (Statele Unite ale Americii).

Prezentat la redacție la 7 septembrie 1976

+ *Catedra de biochimie a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza" Cluj-Napoca*
° *Disciplina de alimentație a Facultății de Zootehnie de la Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" Cluj-Napoca*
* *Department of Food and Resource Chemistry, University of Rhode Island, Kingston, USA*

RESEARCHES ON THE UTILIZATION OF CAROTENOID PIGMENTS. III. THE EFFECT OF THE *HYPPOPHAË RHAMNOIDES* FRUIT OIL ON THE PIGMENTATION OF EGG YOLK

SUMMARY

A 0.5 and 1% percentage of oil obtained from ripe fruit of *Hyppophaë rhamnoides* introduced into the basal diet of Leghorn hens, healthy and ill of mycoplasmosis, intensifies the pigmentation of the body fat from the undercutaneous tissues, of the egg yolk and enhances the biological value of some food products of poultry origin.

The absorption and deposition on carotenoids were carried out selectively the most intense being in the case of xanthophylls with α- and β-structure (lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, isocryptoxanthin) and less intense on the instance of the hydrocarbon carotenoids (α, β, γ-caro-

tene, Neo-β-carotene) and of the epoxide carotenoids (eloxanthin, violaxanthin).

The ripe *Hyppophaë rhamnoides* fruit oil is a valuable material to be used in the poultry diet as a source of carotenoid pigments.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Grigorescu, *Produse farmaceutice*, Ed. medicală, 1971, p. 1.
2. G. Neamțu, C. Bilaus, T. László, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976).
3. I. Brad, F. Silva, O. Cosocariu, E. Iokl, Z. Marcu, G. Martinovski, E. Voicu, (manuscris sub tipar).
4. P. Budowski, A. Bondi, Analyst., **82**, 751 (1957).
5. M. L. Scott, I. Ascarelli, G. Olson, Poultry Sci., **47**, 863 (1968).
6. W. S. Wilkinson, C. Barbee, Poultry Sci., **47**, 1579 (1968).
7. E. Nicoară, D. Osianu, B. Demko, St. cerc. biochim., **17**, 265 (1974).
8. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, London — New York, 1965, p. 1.
9. G. Neamțu, C. Bilaus, T. László, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976)
10. G. Neamțu, Gh. Sălăjan, C. Bilaus, T. László, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 209 (1976).
11. G. Neamțu, Gh. Sălăjan, C. Bilaus, T. László, C. Bodea, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim. (sub tipar).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 71—75 (1977)

CERCETĂRI COMPARATIVE ASUPRA PROTEINELOR ŞI UNOR ENZIME DIN OOCITE LA UNELE SPECII DE PEŞTI TELEOSTEI

DOINA POPOV, OFELIA GOZIA, MARIA CALOIANU-IORDĂCHEL, M. ŞERBAN*

Rezumat. — Proteinele acvosolubile, LDH, MDH, fosfatazele şi esterazele nespecifice prezintă în oocitele peştilor *Teleostei* (scrumbie, crap, mreană, somn) o specificitate de specie. S-a constatat un polimorfism molecular al LDH mai puţin pronunţat la peştii *Teleostei* investigaţi, comparativ cu peştii *Chondrostei*. MDH evidenţiază o singură formă moleculară probabil de tip citoplasmatic, iar ADP şi ATP par a fi substratele energogeneratoare utilizate preferenţial în oocite.

Studiul proceselor metabolice ale diferitelor organe ale peştilor *Teleostei* a constituit obiectul unor cercetări disparate, legate de implicaţiile genetice ale izoenzimelor (1) — (4), de urmărirea specificităţii de organ a acestora (5) (6) şi a influenţei radiaţiilor ionizante (7). Cercetarea proceselor biochimice care au loc în oocite este însă puţin reprezentată în literatură, deşi acestea prezintă un metabolism deosebit de activ, cu implicaţii majore în reproducere şi formarea noului organism

În lucrarea de faţă, ne-am propus cercetarea proteinelor şi a unor enzime din oocitele unor specii de peşti *Teleostei*, din următoarele puncte de vedere : caracterizarea polimorfismului proteinelor sub aspectul fracţionării electroforetice, a rezistenţei faţă de denaturanţi şi a greutăţilor moleculare precum şi cercetarea eterogeneităţii unor dehidrogenaze (LDH şi MDH), transferaze (L-aspartat-2-oxoglutarat aminotransferaza) şi hidrolaze (fosfataze şi esteraze).

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au efectuat pe oocite de scrumbie (*Alosa pontica*), crap (*Cyprinus carpio*), mreană (*Barbus fluviatilis*) şi somn (*Silurus glanis*), extrase în tampon TRIS-HCl 50 mM, pH 7,5, şi prelucrate conform metodei descrise anterior (8). Electroforeza proteinelor şi comportarea acestora faţă de acţiunea denaturantă a temperaturii, ureei (6M) şi tripsinei (1 mg/50 mg proteină) s-a efectuat conform metodei menţionate anterior (8). Gel-filtrarea preparatelor proteice s-a realizat pe coloană de Sephadex G-200 în tampon TRIS-HCl, 50 mM, pH 7,5. Studiul formelor moleculare ale lactat dehidrogenazei (LDH) (EC 1.1.1.27) şi malat dehidrogenazei (MDH) (EC 1.1.1.37) s-a efectuat prin electroforeză în gel de amidon (9), iar activitatea şi formele moleculare multiple ale fosfatazelor (EC 3.1.3.2) şi esterazelor nespecifice (EC 3.1.1) s-au determinat după metoda descrisă anterior (10). Activitatea MDH s-a studiat spectrofotometric (11), iar a L-aspartat-2-oxoglutarat aminotransferazei (AAT) (EC 2.6.1.1) conform metodei utilizate în cazul gonadelor peştilor *Chondrostei* (9). Benzile lipoproteice s-au evidenţiat în prezenţă de Sudan black.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Polimorfismul proteinelor acvosolubile din oocite a fost urmărit sub două aspecte : separarea proteinelor în funcţie de sarcina electrică netă, în cursul electroforezei şi în funcţie de greutăţile moleculare, prin gel-filtrare pe Sephadex G-200.

Oocitele de scrumbie relevă şapte fracţiuni electroforetice în gel de agaroză (fig. 1), fracţiunile 4 şi 5 fiind asociate lipoproteidelor. Remarcabilă este stabilitatea fracţiunilor proteice evidenţiate faţă de acţiunea denaturantă a temperaturii, ureei şi tripsinei, cu excepţia fracţiunii slab electronegative 7, care este degradată în aceste condiţii. Rezistenţa proteinelor faţă de denaturarea termică a fost utilizată de altfel şi ca marker genetic (12).

Oocitele peştilor analizaţi din familia *Cyprinidae* (fig. 1) evidenţiază imagini electroforetice tipice în funcţie de specie, fracţiunile 3 de la crap şi somn fiind de natură lipoproteică. S-a constatat la oocitele de crap, că fracţiunile electroforetice 1 şi 2 sînt denaturate sub influenţa temperaturii şi a proteolizei cu tripsină; proteinele oocitelor de mreană şi somn sînt deosebit de stabile faţă de agenţii denaturanţi testaţi. În cazul somnului, se remarcă totuşi unele modificări ale mobilităţii electroforetice, a proteinelor acvosolubile în urma proteolizei triptice.

Pentru urmărirea greutăţilor moleculare ale proteinelor din oocite, s-au ales în studiu două specii : scrumbia, reprezentantă a familiei *Clupeidae* şi mreana, din familia *Cyprinidae*. Aspectul diagramei de eluţie a proteinelor (fig. 2), diferă însă în funcţie de specie. Astfel, banda lipoproteică 4 — 5 este reprezentată de piscul de greutăţi moleculare mari al oocitelor de scrumbie; proteinele oocitelor de mreană, relevă 4 — 5 tipuri de proteine cu predominanţă a celor de greutate moleculară mare. La ambele specii însă, fracţiunile electroforetice slab electronegative cuprind proteine de greutăţi moleculare mari.

Rezultatele noastre atestă variabilitatea polimorfismului proteinelor acvosolubile din oocite, fapt corelat probabil cu mediile de viaţă ale peştilor *Teleostei* cercetaţi. După Koehn (13), necesitatea adaptării organismelor la factori de mediu diferiţi, a determinat formarea unor sisteme genetice labile, capabile de a răspunde adaptativ mediului. Expresia biochimică a unor astfel de sisteme poate fi considerată existenţa unei game largi de proteine acvosolubile, diferite din punct de vedere al sarcinii electrice nete, al rezistenţei faţă de agenţii denaturanţi şi a greutăţilor moleculare. Factorii de mediu par a fi responsabili, de altfel, şi de variaţiile intraspecifice ale imaginilor electroforetice ale proteinelor serice, la peştii familiei *Cyprinidae* (14).

Activitatea LDH a oocitelor peştilor *Teleostei* investigaţi relevă valori caracteristice speciei (tabela 1), dar mai scăzute la scrumbie, comparativ cu reprezentanţii familiei *Cyprinidae*. Spectrul electroforetic (fig. 3), evidenţiază 2 — 4 benzi izoenzimatice electronegative, cu mobilităţi electroforetice deosebite. Se cunoaşte azi că enzimogramele LDH la peştii *Teleostei* prezintă două izoenzime la unele specii şi 22 la altele şi că imaginile electroforetice sînt caracteristice ţesutului cercetat (15) (16). Totuşi, în oocitele peştilor *Teleostei* analizaţi, polimorfismul LDH este mult mai puţin pregnant comparativ cu cel remarcat de noi anterior în gonadele unor peşti *Chondrostei* (9).

Separarea electroforetică a MDH din oocite (fig. 4), evidenţiază o singură formă moleculară, probabil de tip citoplasmatic. O singură bandă electroforetică a acestei enzime a fost detectată în creier, inimă şi testicole din peştele *Xiphophorus maculatus* (17) şi în gonadele unor specii de peşti

Chondrostei (9). Imagini electroforetice mai complexe ale MDH au fost detectate în spermatozoizii de somon și cod (18) și ouăle de arici de mare (19).

Tabela 1

Activitățile enzimatice ale oocitelor unor specii de pești

Teleostei

(cifrele reprezintă media a 3 determinări)

Specia	Scrumbie	Crap	Mreană	Somn
Activitatea specifică a LDH	378	418	8 800	1 480
Activitatea AAT µmoli/piruvat/ min/ml	375	417	194	597
Activitatea fosfatazică (U.I.)				
Substrate				
β-gli-P	2,90	0,63	1,80	1,20
FDP	2,60	0,53	2,20	1,00
p—NPP	2,90	0,88	1,10	0,40
ATP	2,30	0,73	2,10	1,20
ADP	3,07	1,41	1,70	0,90
G—6—P	2,40	0,56	1,20	0,60
F—6—P	2,90	1,18	—	—

Activitatea AAT din oocite (tabela 1) prezintă valori caracteristice speciei, mult mai mici însă față de cele stabilite în gonadele unor specii de pești *Chondrostei* (9).

Activitatea fosfatazică a oocitelor a fost urmărită sub aspect cantitativ și calitativ. S-a constatat astfel că oocitele peștilor cercetați cuprind fosfataze active asupra unei game largi de substrate (tabela 1), cea mai mare activitate remarcîndu-se la scrumbie. Date din literatură (20), evidențiază la peștii *Teleostei* prezența unor fosfataze acide în stomac, celule hepatice și acini pancreatici.

Interesantă este însă și activitatea nucleozid pirofosfatazică deosebit de puternică a oocitelor (tabela 1). Se pare deci, că în oocitele peștilor *Teleostei* cercetați predomină procese de hidroliză a compușilor macroergici ADP și ATP, procurîndu-se astfel energia metabolică necesară maturării și diviziunilor celulare ulterioare ale oocitelor. Un rezultat similar a fost observat de noi și în cazul oocitelor peștilor *Chondrostei* (10).

Fracționarea electroforetică a formelor moleculare multiple ale fosfatazelor oocitelor relevă imagini caracteristice speciei (fig. 5). Se remarcă însă faptul că formele moleculare ale fosfatazelor oocitelor sînt electronegative și — cu excepția oocitelor de somn — forma moleculară fosfatazică majoritară este asociată benzii lipoproteice.

Fracționarea electroforetică a esterazelor nespecifice a evidențiat prezența în oocite a 3 — 4 fracțiuni electronegative ale acestor enzime, electroforegramele fiind diferite în funcție de specie (fig. 6). Deoarece molecula

esterazei este un homopolimer (probabil un dimer), numărul izoenzimelor acesteia nu este prea mare. Totuşi, studiul genelor ce codifică diferite izoenzime esterazice (21) ca şi spectrele electroforetice ale acestor enzime au constituit mijloace de studiu frecvent utilizate în analiza populaţiilor (3). Se pare că transferinele, LDH şi esterazele sînt proteinele cele mai variabile la peşti (22). Rezultatele noastre evidenţiază deci esteraze nespecifice (aril-, acetil-, colin-, şi carboxilesteraze) cu sarcini electrice nete diferite.

CONCLUZII

1. În oocitele peştilor analizaţi, proteinele acvosolubile, LDH, MDH, fosfatazele şi esterazele nespecifice prezintă specificitate de specie.

2. La speciile ordinului *Teleostei* analizate, polimorfismul LDH este mai puţin pregnant comparativ cu peştii *Chondrostei* (9), iar MDH evidenţiază o singură formă moleculară, probabil de tip citoplasmatic.

3. ADP şi ATP par a fi substratele energogeneratoare utilizate preferenţial în oocite.

Prezentat la redacţie la 4 decembrie 1976

Institutul de ştiinţe biologice,
Colectivul de enzimologie şi
Colectivul de biologie celulară
* *Institutul Agronomic „N. Bălcescu"*
Catedra de chimie

COMPARATIVE STUDIES ON PROTEINS AND ENZYMES FROM THE OOCYTES OF SEVERAL TELEOSTEI SPECIES

SUMMARY

The water-soluble proteins and the enzymes LDH, MDH phosphatase and some esterases are species-specific in *Teleostei* oocytes (mackerel, carp, barbel and waller). The molecular polymorphisms of LDH is less pronounced in the *Teleostei* as compared with the *Chondrostei* fish. The oocytes of the *Teleostei* species show a single MDH enzyme fraction, which appears to to be localized in the cytosol. The results of this study suggest that ADP and ATP were hydrolysed by the nonspecific phosphatases from the oocytes much faster than other naturally occurring substrates in these cells.

BIBLIOGRAFIE

1. T. Wuntch, E. Goldberg, J. Exp. Biol., **174**, *233* (1970).
2. J. Klose, V. Wolf, H. Hitzeroth, H. Ritter, S. Ohno, Humangenetik, **7**, *245* (1969).
3. J. C. Baron, Cah. Orstom., ser. Oceanogr., **11**, *389* (1973).
4. G. M. Somero, M. Soule, Nature, **249**, *670* (1974).
5. H. Gesser, O. Poupa, Comp. Biochem. Physiol. B, **46**, *683* (1973).

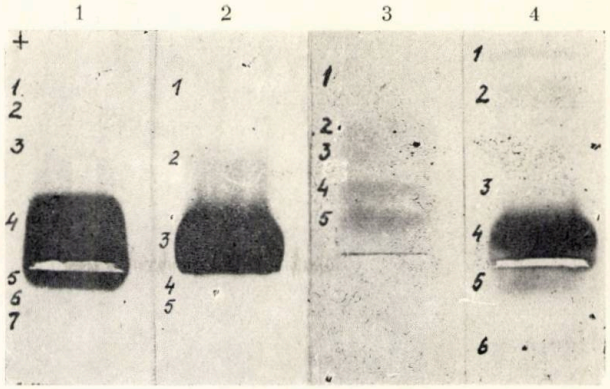


Fig. 1. — Fracționarea electroforetică în gel de agaroză a proteinelor oocitelor de scrumbie (*1*), crap (*2*), mreană (*3*) și somn (*4*).

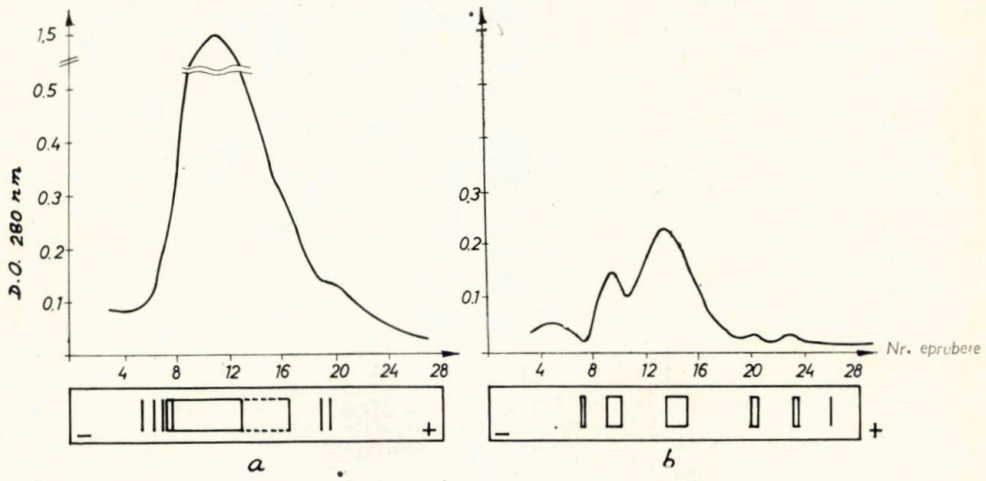


Fig. 2. — Diagrama de eluție de pe Sephadex G-200 a proteinelor oocitelor de scrumbie (*a*) și mreană (*b*).

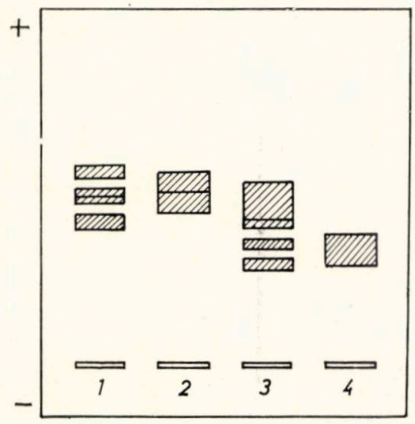


Fig. 3. — Formele moleculare multiple ale LDH din oocite, separate în gel de amidon. Aceleași notații ca în fig. 1.

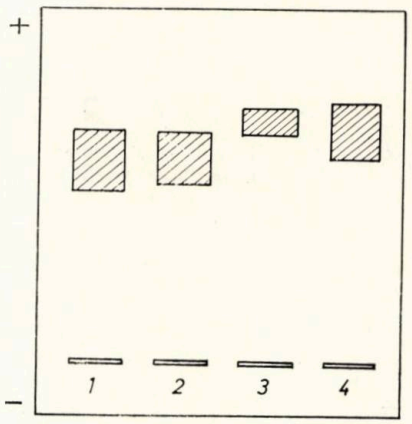


Fig. 4. — Formele moleculare multiple ale MDH din oocite, separate în gel de amidon. Aceleași notații ca în fig. 1.

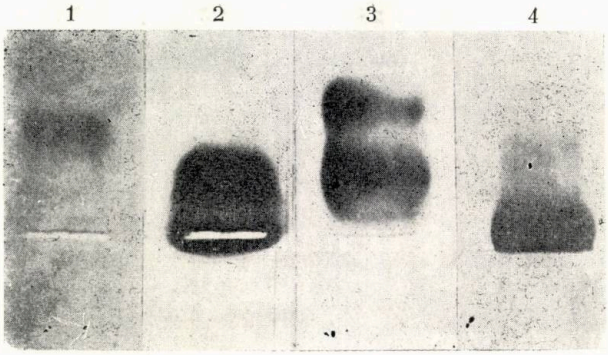


Fig. 5. — Formele moleculare multiple ale fosfatazelor oocitelor, separate în gel de agaroză. Aceleași notații ca în fig. 1.

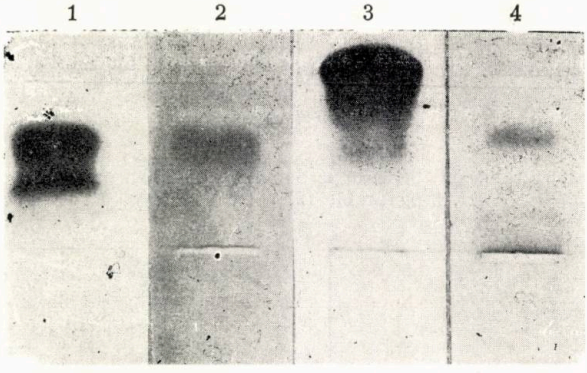


Fig. 6. — Formele moleculare multiple ale esterazelor nespecifice, separate în gel de agaroză. Aceleași notații ca în fig. 1.

6. Soo Thye Lim, R. M. Kay, G. S. Bailey, J. Biol. Chem., **250**, *1790* (1975).
7. J. H. Schröder, *Genetics and mutagenesis of fish*, ed. J. H. Schröder, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, p. 91.
8. M. Caloianu-Iordachel, D. Popov, O. Gozia, M. Șerban, Rev. roum. Biochim., **13**, *185* (1976).
9. M. Șerban, O. Gozia, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **14**, (1977), (sub tipar).
10. D. Popov, M. Șerban, M. Caloianu-Iordachel, Rev. roum. Biochim., **14**, *55* (1977).
11. D. Cotariu, St. cerc. biol., ser. Zool., **23**, *249* (1971).
12. A. A. Kusakina, M. A. Glushankova, N. S. Korobstova, A. A. Neifakh, Ontogenez, **5**, *254* (1974).
13. R. K. Koehn, Rapp. Proc. Verb., Reun., **161**, *147* (1971).
14. J. E. Harris, Comp. Biochem. Physiol., B., **48**, *389* (1974).
15. J. B. Shaklee, K. L. Kepes, V. S. Whitt, J. Exp. Zool., **185**, *217* (1973).
16. Y. W. Kunz, Experientia, **31**, *152* (1975).
17. A. Scholl, *Genetics and mutagenesis of fish*, ed. J. H. Schröder,Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, p. 284.
18. Mounib N. Said, FEBS-lett., **48**, *79* (1974).
19. C. A. Villee, Ann. N. Y. Acad. Sci., **151**, *222* (1968).
20. K. A. Goel, K. V. Sastry, Acta Histochem., **47**, *8* (1973).
21. O. L. Nyman, D. H. Shaw, Comp. Biochem. Physiol., **40**, *563* (1971).
22. V. S. Kirpichnikov, *Genetics and mutagenesis of fish*, ed. J. H. Schröder, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, p. 230.

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 77—81 (1977)

IMOBILIZAREA ALDOLAZEI PRIN LEGARE COVALENTĂ DE CM-AGAROZĂ LEGATĂ ÎNCRUCIŞAT ŞI PROPRIETĂŢILE FIZICO-CHIMICE ŞI CATALITICE ALE CONJUGATULUI ENZIMATIC INSOLUBIL OBŢINUT

H. D. SCHELL, LORA SCOLNIC, MIOARA CÂRSTEANU

Rezumat. — Se prezintă proprietăţile fizico-chimice şi catalitice ale aldolazei imobilizate prin legare covalentă de CM-agaroză legată încrucişat comparativ cu aldolaza liberă. Prin imobilizare aldolaza nu-şi modifică pH-ul ei optim de acţiune, devine mai rezistentă la valori de pH acide şi poate fi refolosită de mai multe ori fără să-şi piardă din activitatea sa catalitică.

Aldolazele sînt enzime care aparţin liazelor şi catalizează reacţia de scindare a esterilor fosforici ai monozaharidelor cu formare de trioze. Termenul de aldolază se atribuie în special fructozo-difosfat-liazei (EC 4.1.2.13) care catalizează reacţia de scindare a esterului fructozo-1,6-difosforic cu formare de esteri gliceroaldehid-3-fosforic şi ester dioxi-aceton-fosforic. Aldolaza este o enzimă relativ larg răspîndită şi se găseşte mai ales în celulele în care se desfăşoară un metabolism glucidic intens şi participă la ciclul de degradare anaerobă a glucidelor în etapa de trecere de la hexoză la trioză.

Întrucît, enzimele prin imobilizare primesc o serie de proprietăţi noi, mai avantajoase atît pentru cercetări fundamentale cît şi pentru aplicaţii practice, ne-am propus în lucrarea de faţă să studiem comportarea aldolazei la imobilizare precum şi proprietăţile fizico-chimice şi catalitice ale preparatului enzimatic insolubil rezultat din cuplarea covalentă a acestei enzime de carboximetil-agaroză legată încrucişat.

Au mai fost descrise preparate de aldolază imobilizate care se caracterizează însă printr-o relativ slabă activitate reziduală enzimatică. Astfel, s-au descris metode de insolubilizare a aldolazei prin includerea ei în geluri de poliacrilamidă (1) — (5), prin legarea ei de derivaţi ai celulozei sau ai polimerului obţinut din etilenă şi anhidridă maleică (6), sau prin legarea ei încrucişată cu N, N'-polimetilen-bis-iodoacetamidă (7).

Folosind ca suport un gel perlat de CM-agaroză legată încrucişat, un suport insolubil cu proprietăţi mecanice excelente şi elaborat recent (8), ne-am pus problema dacă nu se poate obţine pornind de la acest suport nou, un preparat enzimatic cu calităţi superioare celor descrise în prezent în literatura de specialitate.

MATERIAL ŞI METODE

Izolarea aldolazei din muşchi pectorali de pasăre. S-a lucrat după indicaţiile date de Taylor şi colab. (9), procedîndu-se astfel: muşchiul proaspăt prelevat şi omogenizat se extrage la 5°C cu două volume de apă distilată răcită şi se trece prin tifon. Extractul rece este adus

la pH 7,5 cu NaOH şi tratat pînă la 0,5 saturare cu un volum egal de soluţie sulfat de amoniu saturată la temperatura camerei şi ajustată la pH 7,5 cu amoniac concentrat. Soluţia se răceşte la 0°C şi se îndepărtează precipitatul prin filtrare la rece. Apoi, se adaugă suficientă soluţie de sulfat de amoniu pentru a creşte concentraţia extractului la 0,52 saturare. Se lasă la rece mai multe ore sau chiar pînă a doua zi, agitînd din cînd în cînd. Enzima se separă în acest interval de obicei în stare cristalină. Pentru o nouă recristalizare se dizolvă precipitatul de ace fine în puţină apă şi se aduce la pH 7,5. Prin adăugarea soluţiei saturate de sulfat de amoniu, pH 7,5, pînă la apariţia unei slabe turbidităţi, se formează în decurs de cîteva ore la rece, un slab precipitat amorf care se îndepărtează prin filtrare. Cristalele încep să se separe din nou la adăugare de soluţie saturată de sulfat de amoniu pH 7,5, la o concentraţie a extractului de mai puţin 0,5 saturare la rece.

Legarea covalentă a aldolazei de CM-agaroză legată încrucişat. 10 ml gel perlat de carboximetil-agaroză legată încrucişat, se tratează cu 10 ml extract aldolază (concentraţia proteică 20 mg/ml) în prezenţă de 300 mg carbodiimidă solubilă EDC şi se agită electromagnetic pînă a doua zi. Conjugatul enzimatic obţinut este spălat apoi pe o pîlnie filtrantă la trompă de apă, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegată de suport, mai întîi cu o soluţie tampon acid acetic-acetat, pH 4,5, 0,1 M, cu şi fără NaCl 1 M, apoi cu o soluţie tampon borat, pH 8,6, 0,1 M, de asemenea, cu şi fără NaCl 1M, şi suspendat în tampon TRIS-HCl, pH 8,6. Preparatul enzimatic se păstrează suspendat în soluţie tampon sau în apă distilată la 3 — 4° C, pînă la folosire.

Determinarea activităţii enzimatice ale aldolazei libere şi legate, a fost efectuată după metoda Sibley şi Lehninger (10), modificată de Srivasteva şi Berlinguet (11), în următorul mediu de reacţie, incubat 15 min, la 37°C : 0,2 ml enzimă cu o concentraţie proteică de 0,98 mg/ml sau 0,5 ml gel enzimatic (concentraţia proteică 2,8 mg/ml gel), 1,4 ml tampon TRIS-HCl, 0,1M, pH 8,6, 0,2 ml hidrazină (Carlo Erba, Milano) 0,56 M, pH 8,6 şi 0,2 ml fructozo-1,6-difosfat (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) 0,05 M, pH 8,6. Reacţia enzimatică a fost oprită îndepărtînd enzima imobilizată prin filtrare la trompă, sau adăugînd 2 ml acid tricloracetic 10% în cazul enzimei libere şi centrifugare pentru îndepărtarea precipitatului proteic format. La 1 ml supernatant se adaugă 1 ml NaOH 0,75 N, şi se lasă la temperatura camerei 10 min. Apoi, se adaugă 1 ml 2,4-dinitrofenil-hidrazină (Chemapol, Praga) $1^0/_{00}$ şi se lasă la 37°C, timp de 1 oră. Amestecul de reacţie este apoi tratat cu 7 ml NaOH 0,75 N, şi se citeşte intensitatea culorii date de cromogenul format, după 10 min, la 540 nm. Paralel se determină şi fosforul alcali-labil după metoda Fiske-SubbaRow (12). Rezultatele sînt exprimate în μmoli FDP scindat/mg proteină/oră la 37°C.

Determinarea randamentului de cuplare s-a efectuat prin dozarea proteinei legate de suport cu ajutorul micrometodei Parnas în urma kjeldahlizării unei cantităţi cunoscute de gel enzimatic.

Influenţa pH-ului asupra activităţii enzimei libere şi legate s-a urmărit determinînd activitatea enzimatică a celor două forme de enzime la valori de pH situate la 6,0; 7,0; 8,0 şi 9,0.

Influenţa temperaturii asupra activităţii enzimatice a aldolazei libere şi legate s-a determinat urmărind activitatea enzimatică la temperaturi de 25, 35, 45, 50, 60 şi 70°C.

Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de cantitatea enzimei din amestecul de reacţie, s-a urmărit folosind în cazul enzimei libere 0,05, 0,10, 0,15 şi 0,20 ml soluţie de enzimă, iar în cazul enzimei imobilizate 0,25, 0,50, 0,75 şi 1,00 ml gel enzimatic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Extractul de aldolază obţinut din muşchiul pectoral de pasăre şi purificat prin precipitări fracţionate cu sulfat de amoniu, are un conţinut proteic de 20 mg proteină/ml şi o activitate specifică de 120 μmoli FDP scindat/mg proteină/oră, la 37°C. Preparatul enzimatic insolubil obţinut prin legarea covalentă a aldolazei de CM-agaroză legată încrucişat are un conţinut proteic de 2,8 mg proteină/ml gel şi o activitate specifică de 16 μmoli FDP scindat/mg proteină/oră la 37°C, ceea ce corespunde la o activitate reziduală de 13,3%. Această valoare este superioară celor găsite de alţi autori pentru preparatele imobilizate ale aldolazei obţinute prin alte procedee. Astfel, imobilizînd aldolaza prin includere în gel de poli-

acrilamidă, Bernfeld și Wan (1), obțin un preparat enzimatic cu activitate reziduală de 4%; prin legarea covalentă a aldolazei de p-deazobenzil-celuloză sau de AE-celuloză, Jackson și Falb (6), realizează preparate insolubile cu activități reziduale de 7%, respectiv 9%, iar prin cuplare de poli-(etilen-anhidridă maleică) de 10%. Doar preparatul insolubil obținut prin legarea încrucișată a aldolazei cu N,N'-polimetilen-bis-(iodoacetamidă), prezintă o activitate considerabil mai ridicată și situată la 40% față de enzima liberă (7).

Prin legarea covalentă de suportul insolubil, aldolaza nu-și modifică pH-ul ei optim de acțiune (fig. 1). Din aceeași figură rezultă totodată, că prin imobilizare, enzima studiată devine mai puțin sensibilă la influența valorii de pH situate spre domeniul acid de la pH-ul optim. Astfel, în timp ce enzima liberă își pierde aproape 50% din activitatea ei prin micșorarea pH-ului optim cu o unitate, cea imobilizată, pierde în aceste condiții doar 6% din activitate. Spre domeniile alcaline nu se mai constată o comportare deosebită între cele două forme de aldolază.

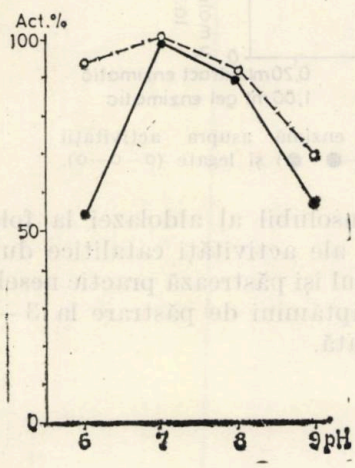


Fig. 1. — Influența pH-ului asupra activității enzimatice a aldolazei libere (●—●—●) și legate (o—o—o)

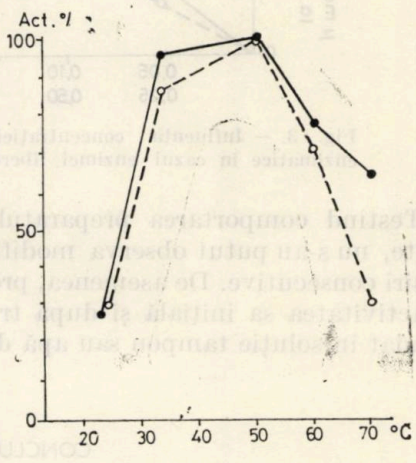


Fig. 2. — Influența temperaturii asupra activității enzimatice a aldolazei libere (●—●—●) și legate (o—o—o).

O comportare destul de asemănătoare a celor două forme de enzimă se constată la studiul influenței diferitelor temperaturi asupra activității catalitice ale acestora (fig. 2). Astfel, activitatea enzimatică maximă se observă atît la enzima liberă cît și la cea legată de o temperatură de 50°C. La 30°C, activitatea se reduce nesemnificativ la ambele forme ale enzimei, dar se micșorează puternic la scăderea temperaturii la 25°C, ajungînd aproximativ la 1/3 din activitatea lor inițială. Prin creșterea temperaturii la peste 50°C se observă de asemenea, o scădere a activității enzimatice, mai puțin pronunțată la 60°C și mai accentuată la 70°C, cînd activitatea

enzimei legate se reduce, ca și la 25°C, la 1/3 din activitatea inițială, fapt relativ rar întîlnit la enzimele insolubilizate.

În figura 3 se prezintă variația activității enzimatice în funcție de cantitatea enzimei libere sau legate folosite în reacție. În ambele cazuri se poate observa o creștere liniară a activității aldolazice cu creșterea concentrației enzimei din mediul de reacție.

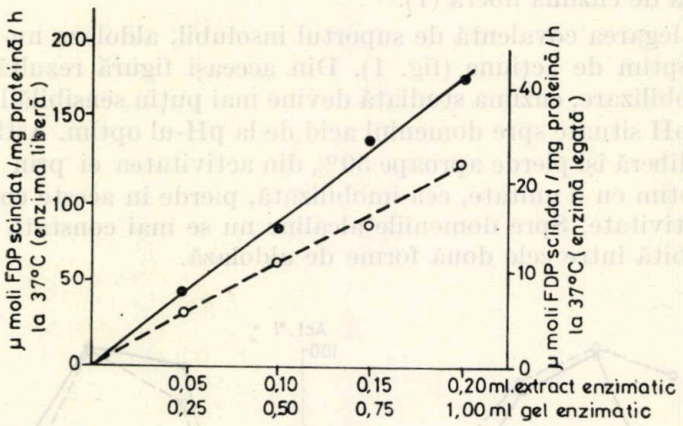


Fig. 3. — Influența concentrației de enzimă asupra activității enzimatice în cazul enzimei libere (●—●—●) și legate (o—o—o).

Testînd comportarea preparatului insolubil al aldolazei la folosiri repetate, nu s-au putut observa modificări ale activități catalitice după 6 refolosiri consecutive. De asemenea, produsul își păstrează practic neschimbată activitatea sa inițială și după trei săptămîni de păstrare la 3—4°C, suspendat în soluție tampon sau apă distilată.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a aldolazei de CM-agaroză legată încrucișat se obține un preparat enzimatic cu o activitate reziduală de 13,3%.

2. Prin imobilizare, aldolaza nu-și modifică pH-ul ei optim de acțiune și devine mai rezistentă față de valori de pH acide.

3. Preparatul enzimatic insolubil al aldolazei nu-și modifică activitatea catalitică după primele 6 refolosiri repetate și nici după o păstrare de trei săptămîni la 3 — 4°C.

Prezentat la redacție la 30 decembrie 1976

Institutul de științe biologice
Colectivul de enzimologie

IMMOBILISIERUNG DER ALDOLASE DURCH KOVALENTE BINDUNG AN VERNETZTE CM-AGAROSE UND DIE PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN DES ERHALTENEN UNLÖSLICHEN ENZYMKONJUGATES

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die physikalisch-chemischen und katalytischen Eigenschaften der an vernetzte CM-Agarose kovalent gebundenen Aldolase im Vergleich zum nicht gebundenen Enzym gegeben. Durch Bindung an den unlöslichen Träger verändert die Aldolase ihr pH-Optimum nicht, wird beständiger gegenüber sauern pH-Werten und kann ohne Einbusse der enzymatischen Aktivität mehrere Male wiederverwendet werden.

BIBLIOGRAFIE

1. P. Bernfeld, J. Wan, Sci., **142**, *678* (1963).
2. T. M. S. Chang, F. C. Macintosh, S. G. Mason, Can. J. Physiol. Pharmacol. **44**, *115* (1966).
3. T. M. S. Chang, A. Pont, L. J. Jonhson, N. Malave, Trans. Amer. Soc. Artif. Organs, **14**, *163* (1968).
4. H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay, J. Chromatogr., **35**, *103* (1968).
5. P. Bernfeld, R. E. Bieber, P. C. Mac Donnell, Arch. Biochem. Biophys., **127**, *779* (1968).
6. L. Jackson, R. D. Falb, citat după G. J. H. Melrose, Rev. Pure and Appl. Chem., **21**, *83* (1971).
7. H. Ozawa, J. Biochem. (Japan), **62**, *531* (1967).
8. H. D. Schell, M. A. Mateescu, Tr. Bentia, Brevet înregistrat la O.S.I.M., 1976.
9. J. J. Taylor, A. A. Green, B. T. Cori, J. Biol. Chem., **173**, *591* (1948).
10. I. A. Siebley, A. L. Lehninger, J. Biol. Chem., **177**, *859* (1949).
11. U. Srivastava, L. Berliquet, Can. J. Biochem., **42**, *1301* (1964).
12. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1921).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 83 — 86 (1977)

INFLUENŢA IONULUI DE POTASIU ŞI RUBIDIU ASUPRA ACTIVITĂŢII ALDOLAZEI DIN MUŞCHIUL GASTROCNEMIAN DE BROASCĂ

LORA SCOLNIC

Rezumat. — Ionul de potasiu introdus în mediul de imersie a muşchiului gastrocnemian de broască determină scăderea activităţii aldolazice. Ionul de rubidiu se comportă similar celui de potasiu, ceea ce arată nespecificitatea acestuia din urmă în ceea ce priveşte activitatea aldolazei. Nu se înregistrează activitate aldolazică în mediul de imersare a muşchiului.

Ca multe celule vii, fibrele nervoase şi musculare folosesc energia metabolică pentru a deplasa Na^+ şi K^+ împotriva gradienţilor de concentraţie. În ţesuturile excitabile, acest proces prezintă un interes deosebit, deoarece este răspunzător de diferenţele de concentraţie de care depinde conducţia impulsurilor.

Este cunoscut faptul că la concentraţii externe crescute de K^+ se modifică metabolismul muscular (1) — (6), transportul activ al unor substanţe în diferite ţesuturi (7) — (12), ca şi unele caracteristici fizice ale membranei musculare (13) — (17).

Ionul de Rb^+, care se ştie că poate substitui K^+ în ţesutul muscular, (18) — (21), se comportă asemănător acestuia în acţiunea sa asupra celulei vii. Cu toate acestea, Muller şi colab. (3) semnalează o comportare diferită a acestor doi ioni asupra glicolizei musculare.

În lucrări anterioare (22) (23), am pus în evidenţă faptul că ionii de K^+ şi Rb^+ influenţează în acelaşi sens conţinutul în acid lactic al muşchilor sartorius şi gastrocnemian de broască, şi anume produc scăderea semnificativă a acestui conţinut.

Deşi efectul K^+ asupra glicolizei a format obiectul unor numeroase cercetări, nu s-a reuşit totuşi să se stabilească o relaţie între acest efect şi un anumit stadiu din lanţul de degradare glicolitică.

De aceea, ne-am propus să analizăm influenţa K^+ şi a substituentului său Rb^+ asupra activităţii aldolazei, una dintre enzimele cheie ale lanţului de degradare glicolitică.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe broaşte (Rana ridibunda) cărora nu li s-a aplicat nici un tratament prealabil.

După amputarea simultană a picioarelor posterioare, muşchii gastrocnemieni au fost izolaţi cu atenţie, în vederea evitării traumatismului, tamponaţi uşor pe hîrtie de filtru, cîntăriţi, apoi imersaţi în soluţiile corespunzătoare.

La martor, muşchii au fost imersaţi în 12 ml soluţie Ringer-Jendrasik (24), conţinînd la litru 6,5 g clorură de sodiu, 0,2 g clorură de potasiu, 0,2 g clorură de calciu şi 0,1 g bicarbonat de sodiu. În vederea studierii efectului concentraţiilor diferite de ioni de K^+ şi Rb^+, muşchii erau introduşi în Ringer, care, în locul KCl, conţinea KCl şi RbCl în concentraţie de 20, respectiv 50 mM/l, ceilalţi constituenţi fiind în concentraţia menţionată mai sus.

Mușchii au fost imersați timp de $3^1/_2$ ore, sub barbotare continuă și constantă cu un curent de oxigen. La intervale de aproximativ 20 min, conținutul vasului de imersie se agita ușor. După îndepărtarea din soluția Ringer corespunzătoare, mușchii au fost imediat tamponați ușor cu hîrtie de filtru, înghețați, cîntăriți, apoi omogenizați la rece într-un omogenizator Potter, cu tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH 7, 6, în raport de 3/1 (v/g). După 1 oră de extracție la +4°C, omogenatul a fost centrifugat 20 min la 5000 g (+ 4°C). Activitatea enzimatică, determinată după metoda Lehninger (25), modificată de Srivastava și Berliquet (26), s-a urmărit în următorul mediu de reacție, incubat 30 min, la 37°C : 0,2 ml extract 0,1%; 1,4 ml tampon TRIS—HCl 0,1 M, pH 8,6; 0,2 ml hidrazină 0,56 M, pH 8,6 și 0,2 ml fructozo-1,6-difosfat 0,05 M, pH 8,6. Reacția a fost oprită la temperatura camerei cu 2 ml acid tricloracetic 10%. După centrifugare, triozo-fosfații care se formează sînt determinați în supernatant, incubat apoi timp de 1 oră cu 2,4-dinitrofenilhidrazină la 37°C. Citirile s-au efectuat la 540 nm. Probele de control erau preparate în același mod, dar cu substratul adăugat după acidul tricloracetic.

Dat fiind că literatura semnalează difuzia enzimelor glicolitice la imersarea mușchilor în soluție fiziologică (27), s-a urmărit, în paralel, activitatea enzimatică și din mediul de incubare, folosind volume diferite de soluție Ringer, între 0,5 — 5 ml.

Activitatea aldolazică a fost calculată în raport de triozo-fosfații alcalii-labili ce se formează în aceleași condiții. Rezultatele sînt exprimate în μM FDP scindate/mg proteină/oră, la 37°C.(28)

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Înainte de a trece la determinările propriu-zise, am urmărit activitatea aldolazică la mușchii gastrocnemieni normali de broaște și am constatat că mușchii simetrici ai aceleiași broaște prezintă, practic, aceeași activitate aldolazică. Acest fapt a permis să se treacă la urmărirea influenței tratamentului aplicat, pe același animal.

În tabela 1 sînt redate valorile activității aldolazice la mușchiul gastrocnemian de broască imersat în soluție Ringer-Jendrasik, cu adaos de cantități diferite de KCl. După cum rezultă din tabelă, adaosul în mediul de imersie a KCl, în concentrație de 20, respectiv 50 mM/l, determină scăderea activității aldolazice.

Tabela 1

Activitatea aldolazică la mușchiul gastrocnemian de broască imersat în soluție Ringer-Jendrasik cu adaos de cantități diferite de KCl

Mușchi martor = *M*

Mușchi tratat = *K*

Greutatea mușchilor (g)		Concentrația KCl (mM/l)	μM FDP scindat/mg proteină /oră la 37°C	
M	*K*		*M*	*K*
0,60	0,62	20	106	68
0,87	0,85	20	145	139
0,57	0,60	20	96	89
0,68	0,69	20	110	98
Media 0,68	0,69		114	99
0,61	0,58	50	120	98
0,65	0,63	50	118	92
0,48	0,45	50	89	70
0,60	0,55	50	97	76
Media 0,58	0,55		106	84

Menționăm că deși unii autori au semnalat că la imersarea mușchiului are loc difuzia unor enzime glicolitice în mediul de imersie (28), difuzia accentuată de prezența ionilor de potasiu (29), noi nu am putut detecta prezența activității aldolazice în mediul înconjurător.

S-ar putea ca rezultatele diferite obținute de noi să se datoreze faptului că am lucrat pe mușchi gastrocnemian, în timp ce autorii menționați, pe mușchi diafragmic de șobolan (28).

După cum rezultă din tabela 2, și în cazul Rb^+ se constată scăderea activității aldolazice, ceea ce denotă că efectul K^+ asupra activității aldolazei nu este specific.

Tabela 2

Activitatea aldolazică la mușchiul gastrocnemian de broască imersat în soluție Ringer-Jendrasik, cu adaos de cantități diferite de RbCl

Greutatea mușchilor (g)		Concentrația RbCl (mM/l)	μM FDP scindat/mp proteină/oră la 37°C	
M	*Rb*		*M*	*Rb*
0,70	0,65	20	105	87
0,53	0,58	20	93	75
0,40	0,43	20	120	102
0,56	0,53	20	111	96
Media 0,55	0,55		107	90
0,60	0,68	50	130	112
0,80	0,75	50	116	96
0,50	0,55	50	123	106
0,60	0,56	50	97	75
Media 0,60	0,63		116	97

Similitudinea efectelor K^+ și Rb^+ a fost amplu semnalată prin cercetări fiziologice (1) (15) (30) — (33) și farmacologice (34) — (37) și de alți autori.

Rezultă că atît K^+ cît și Rb^+ determină scăderea activității aldolazei, ceea ce poate explica scăderea conținutului în acid lactic (22) (23), sub influența acestora, semnalată anterior de noi.

CONCLUZII

1. Adaosul ionilor de K^+ în concentrațiile de 20 și 50 mM/l în mediul de imersie a mușchiului gastrocnemian de broască, determină scăderea activității aldolazice.

2. Ionii de Rb^+ se comportă similar celor de K^+, ceea ce arată nespecificitatea acestora din urmă în ceea ce privește activitatea aldolazei.

3. Nu se înregistrează activitate aldolazică în mediul de imersare a mușchiului.

Prezentat la redacție la 13 iulie 1976

Institutul de științe biologice
Colectivul de enzimologie,
București.

THE EFFECT OF POTASSIUM AND RUBIDIUM IONS UPON ALDOLASE ACTIVITY IN FROG GASTROCNEMIUS MUSCLE

SUMMARY

Potassium ions introduced in the immersion medium of frog gastrocnemius muscle induce the decrease of aldolase activity. The effect of rubidium ions upon aldolase activity is similar to that produced by potassium ions; this fact proves that the effect of potassium is not specific. There is no aldolase activity in the immersion medium of the muscle.

BIBLIOGRAFIE

1. A. V. Hill, J. V. Howarth, Proc. Roy. Soc. (London B), *147*, 21 (1957).
2. A. H. Hegnauer, W. O. Fenn, D. M. Cobb, J. Cell. Comp. Physiol., *4*, 505 (1934).
3. M. Muller, S. E. Simon, Biochim. Biophys. Acta, *37*, 107 (1960).
4. I. Navatny, F. Yuskicil, L. Yyklicky, R. Beranek, Physiol. Bohemoslov, *11*, 277 (1962).
5. L. Lundholm, T. Rall, N. Venos, Acta Physiol. Scand., *70*, 127 (1967).
6. G. P. Briner, S. E. Simon, R. Frater, P. Tasker, Biochim. Biophys. Acta, *35*, 485 (1959).
7. E. Riklis, J. H. Quastel, Can. J. Biochem. Physiol., *36*, 347 (1958).
8. A. Kleizeller, A. Kotyk, Biochim. Biophys. Acta, *54*, 367 (1961).
9. E. C. Foukles, B. F. Miller, în A. Kleizeller, A. Kottyk, Membr. Transp. and Metab. Acad. Press Lond. 1961, p. 559.
10. B. M. Burg, I. Orloff, Am. J. Physiol., *202*, 565 (1962).
11. M. Fox, S. Thier, L. Rosemberg, S. Segal, Biochim. Biophys. Acta, *79*, 167 (1964).
12. W. O. Beradt, E. C. Beechwood, Am. J. Physiol., *208*, 642 (1965).
13. H. J. Kurtis, K. S. Kole, J. Cell. Comp. Physiol., *19*, 135 (1942).
14. G. W. Ling, R. W. Gerard, J. Cell Comp. Physiol., *34*, 383 (1949).
15. H. P. Jenerick, J. Cell. Comp. Physiol., *42*, 427 (1953).
16. C. Edwards, E. J. Harris, J. Physiol., *135*, 567 (1957).
17. E. J. Harris, J. Gen. Physiol., *41*, 169 (1957).
18. L. B. Mandel, O. E. Classon, Amer. J. Physiol., *16*, 152 (1906).
19. P. H. Mitchell, J. W. Wilson, R. E. Stanton, J. Gen. Physiol., *4*, 141 (1921).
20. L. A. Happel, C. A. A. Schmidt, Univ. California Publ. Physiol., *8*, 189 (1938).
21. A. S. Relmann, A. T. Lambie, B. A. Burrows, A. M. Roy, J. Clin. Invest., *36*, 1249 (1957).
22. L. Scolnic, St. Cerc. Bioch., *15*, 289 (1972).
23. L. Scolnic, St. Cerc. Bioch., *16*, 53 (1973).
24. L. Jendrassik, I. Faiszt, Rolando Eötvos Nominatae Sect. Biol., *1*, 133 (1957).
25. I. A. Sibley, A. L. Lehninger, J. Biol. Chem., *177*, 859 (1949).
26. U. Srivastava, L. Berliquet, Can. J. Biochem., *42*, 1301 (1964).
27. K. L. Zierler, R. I. Levy, R. Anders, Bull Johns Hopkins Hosp., *92*, 7, (1953).
28. C. H. Fiske, Y. Subba-Row, J. Biol. Chem., *66*, 375 (1925).
29. K. L. Zierler, Am. J. Physiol., *185*, 1 (1956).
30. W. Pickard, I. V. Letwin, I. M. Moore, M. Takato, I. Polar, T. Bernstein, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S., *52*, 1177 (1964).
31. A. Solandt, J. Physiol., *86*, 162 (1936).
32. P. Feng, Y. M. Liu, J. Cell. Comp. Physiol., *34*, 33 (1949).
33. A. Sandow, H. Mandel, J. Cell. Comp. Physiol., *38*, 271 (1951).
34. R. Hazard, I. R. Boissier, J. Hazard, P. Mouille, Compt. Rend., *243*, 454, (1956).
35. R. Hazard, M. Beauvalet, I. R. Boissier, F. Larno, P. Mouillé, Compt. Rend. Soc. Biol., *152*, 238 (1958).
36. R. Hazard, I. Hazard, T. Thouvenat, Compt. Rend. Soc. Biol., *151*, 2049 (1957).
37. A. S. Relman, M. Roy, W. B. Schwartz, J. Clin. Invest., *34*, 538 (1955).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 87 — 94 (1977)

ENZIME PECTOLITICE DIN *ASPERGILLUS NIGER*. V. PRODUCEREA ENZIMELOR PECTOLITICE ÎN PREZENŢA SUBSTANŢELOR PECTICE

S. VASU

Rezumat. — Urmărindu-se producerea enzimelor pectolitice (PG, PMG, PTE şi PME), în culturile de A. niger ICA-34, obţinute în prezenţa diferitelor cantităţi de acizi pectinici şi pectici se arată că PG şi PMG sînt enzime constitutive iar PTE şi PME inductive. Prezenţa substanţelor pectice în mediile de cultură determină sau stimulează biosinteza enzimelor pectolitice inductive şi constitutive, iar cantitatea acestora depinde de intervenţia proceselor de represie catabolică. Represia catabolică a enzimelor inductive, PTE şi PME, s-ar realiza prin produşii de catabolizare ai unei surse de carbon uşor metabolizate ca de exemplu glucide neuronidice.

Este cunoscut faptul că multe microorganisme produc constitutiv sau inductiv enzimele pectolitice *); biosinteza PG, PMG, PME şi PTE este stimulată sau în unele cazuri determinată de prezenţa substanţelor pectice în mediile de cultură. Avînd în vedere doar unele specii de Aspergillus, ca Aspergillus niger şi Aspergillus foetidus, s-a arătat de ex. (1) (2) (3) (4) (5) că producerea de diferite tipuri de PG şi PMG depinde de prezenţa sau absenţa pectinelor ca şi de faptul dacă dezvoltarea miceliului se realizează submers sau la suprafaţa mediilor de cultură. S-a arătat de asemenea pentru aceste specii că biosinteza PMG (6) (7) şi a PTE (8) este indusă de substanţe pectice.

Producerea de PG şi PME în Penicillium chrysogenum (9) este indusă nu numai de acizii pectici sau pectinici ci şi de guma tragacant, de acizii D-galacturonic, L-galacturonic şi mucic, iar biosinteza PG în Phytium de barianum (10) este stimulată pe lîngă substanţele pectice de unele glucide ca fructoză, galactoză şi manoză, iar în cazul lui A. niger în mare măsură de către lactoză (5).

Datele menţionate sînt suficiente pentru a sublinia importanţa condiţiilor de cultivare, în special, a compoziţiei chimice a mediilor de cultură, în care cresc şi se dezvoltă microorganismele pentru biosinteza diferitelor enzime pectolitice.

Luînd în considerare cele de mai sus, ne-am propus să urmărim mai îndeaproape producerea PTE şi PME din A. niger în condiţiile cultivării acestui fung în prezenţa substanţelor pectice; să vedem dacă substanţele uronidice intervin în reglarea producerii şi eliberării extracelulare a acestor enzime inductive ca şi în cazul PG şi PMG, care după cum am arătat în lucrări anterioare (5) (11) sînt produse constitutiv de către A. niger şi totodată prezintă o distribuţie intracelulară întrucîtva diferită (12) faţă de PTE şi PME.

*) Vom folosi următoarele prescurtări pentru enzimele pectolitice: PG = poligalacturonaza, PMG = polimetilgalacturonaza, PTE = pectin-trans-eliminaza şi PME = pectin-metilesteraza.

Din rezultatele pe care le prezentăm reiese că reglarea producerii enzimelor pectolitice inductive PTE și PME se realizează diferit decît în cazul enzimelor constitutive, respectiv PG și PMG.

MATERIALE ȘI METODE

A. niger ICA-34 (din colecția ICICA-București) a fost cultivat în culturi de suprafață pe mediul Raulin modificat (5) după cum am arătat în alte lucrări (5) (11).

Ca surse energetice și de carbon s-a folosit zaharoza (5) (11), aceizii pectinici (Pectine NF-Serva) și acizi pectici (polygalacturonic acid-Serva).

Culturile de A. niger, de diferite vîrste (3 — 9 zile) au fost prelucrate pentru stabilirea greutății miceliului uscat, obținerea omogenatelor de miceliu și a lichidelor de cultură după cum s-a arătat anterior (5).

In omogenatele de miceliu (10%) și lichidele de cultură s-a determinat :

— *activitatea PG și PMG*, prin scăderea vîscozității acizilor pectici (PG_1) și acizilor pectinici (PMG_1), precum și prin creșterea puterii reducătoare a sistemelor de reacție care conțineau acizi pectici (PG_2) și acizi pectinici (PMG_2), după cum am arătat în lucrări anterioare (5) (11). Unitatea PG_1 și PMG_1 este cantitatea de enzimă care reduce vîscozitatea acizilor pectici sau pectinici (9 ml sol. 1% + 1 ml extract enzimatic ; pH 4,1 ; 30°C) cu 50% în timp de 10 min. (numărul invers al acestui timp este direct proporțional cu concentrația enzimei) (1) (5). Unitatea PG_2 și PMG_2 este cantitatea de enzimă care produce 1 μ mol grupări aldehidice în timp de 1 min., la 30°C și pH 4,2 (2,5 ml acizi pectici sau pectinici 1% + 0,5 ml extract enzimatic + apă la volum final de 5 ml).

— *activitatea PTE* s-a determinat spectrofotometric, după metoda descrisă de Albersheim (13) măsurînd creșterea densității optice la 235 nm a acizilor pectinici 0,5%, pH 5,2 (6 ml + 0,3 ml extract enzimatic). Unitatea PTE este cantitatea de enzimă care conduce la o creștere a DO_{235nm} de 0,555 (d = 1 cm), în timp de 1 min., la pH 5,2.

— *activitatea PME* s-a urmărit prin determinarea grupărilor carboxil (14) rezultate din hidroliza grupărilor metil-esterice din acizi pectinici (4,5 ml sol.1%, pH 4,6 + 0,5 ml extract enzimatic, 30°C). Unitatea PME este cantitatea de enzimă care eliberează 1 μ mol grupări carboxilice în timp de 1 min.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Prezența substanțelor pectice în mediile de cultură stimulează producția PTE și PME. După cum rezultă din tabela 1, precum și din unele date publicate anterior (5) (11) A. niger ICA-34 indică o slabă activitate PTE și PME ; activitatea acestor enzime crește însă remarcabil în condițiile cultivării fungului pe medii ce conțin substanțe pectice, în special acizi pectinici. Astfel din tabela 1 și fig. 1, se vede că activitatea PTE crește odată cu cantitatea de substanțe pectice din mediile de cultură înregistrînd un maxim în culturile care conțin ca principală sursă de carbon numai acizi pectinici. În culturile în vîrstă de 5 zile, activitatea PTE este de cca 66 de ori mai mare decît activitatea manifestată de culturile de A. niger obținute în absența substanțelor pectice.

Creșterea activității PTE în miceliu după cum se vede în figura 1, se realizează treptat odată cu creșterea concentrației substanțelor pectice în mediul de cultură ; în cazul PTE extracelulare, activitatea crește de odată cu cantitatea de substanțe pectice din mediu și înregistrează o creștere masivă în probele care conțin numai acizi pectinici și pectici. Aceste din urmă fapte rezultă și din figura 2, în care prezentăm în funcție de vîrsta culturilor, activitatea PTE intra- și extracelulară din probele obținute în prezență de acizi pectinici, pectici și zaharoză.

Tabela 1

Activitatea enzimelor pectolitice din A. niger ICA – 34, cultivat timp de 5 zile în prezența acizilor pectici sau pectinici (probe a 50 ml mediu de cultură însămînțate cu 10^6 spori; activitatea enzimelor exprimată procentual față de cultura martor, obținută în prezență de zaharoză; cifrele din paranteză reprezintă suma activităților intra- și extracelulare din cultura martor exprimată în unități/g miceliu uscat)

Sursa de carbon*)	Miceliul uscat (g)	PMG_1	PG_1	PMG_2	PG_2	PTE	PME
4% zaharoză	1,211	(273,0) 100	(202,8) 100	(19,7) 100	(78,9) 100	(0,35) 100	(21,9) 100
0,5% acizi pectinici	1,276	123	139	122	128	154	158
1 % acizi pectinici	1,186	157	126	122	139	400	251
2% acizi pectinici	1,169	139	51	150	126	644	325
3% acizi pectinici	0,876	94	39	198	160	858	532
4% acizi pectinici	0,487	55	54	323	153	6 652	954
0,5% acizi pectici	1,227	95	116	147	129	327	105
4% acizi pectici	0,257	67	134	201	149	2 857	725

* Completarea pînă la 4% glucide se realiza prin adaosul de zaharoză.

În prezența substanțelor pectice activitatea intracelulară crește treptat sau rămîne la un nivel aproape constant (în culturile care conțin acizi pectici) și totodată are loc o eliminare masivă de enzime în mediul de cultură; în prezența zaharozei activitatea PTE din miceliu și mediu de cultură rămîne la un nivel relativ scăzut, indiferent de vîrsta culturilor.

Referindu-ne la PME, după cum reiese din tabela 1 și figurile 3 și 4, producția acestor enzime ca și a PTE depinde în mare măsură de prezența substanțelor pectice în mediile de cultură; activitatea PME crește odată cu cantitatea de pectine din mediile de cultură, creșterea realizîndu-se treptat atît intracelular cît și extracelular. Față de probele cu zaharoză, activitatea PME în culturile care conțin acizi pectinici sau pectici se mărește de aproximativ 1,1 — 9,5 ori, în funcție de cantitatea acestor substanțe conținute în mediul de cultură. Se remarcă de asemeni că, în funcție de vîrsta culturilor, în cazul celor obținute în prezența pectinelor (fig. 4), activitatea PME crește relativ puțin în miceliu și mult în mediul de cultură.

Dacă luăm în considerare unele caracteristici ale substanțelor pectice folosite în prepararea mediilor de cultură ca de ex. grupele metoxil și gradul de esterificare care în cazul substanțelor utilizate au fost pentru :

— acizi pectinici 5,9% grupe metoxil și 63,6% esterificare

— acizi pectici 0,7% grupe metoxil și 2,1% esterificare ar fi fost poate de așteptat ca în prezența acizilor pectici, A. niger să nu producă PME și PTE, iar activitatea PMG_1 și PMG_2 să nu fie mult crescută față de probele în care fungul se dezvoltă în prezență de zaharoză. Cu toate

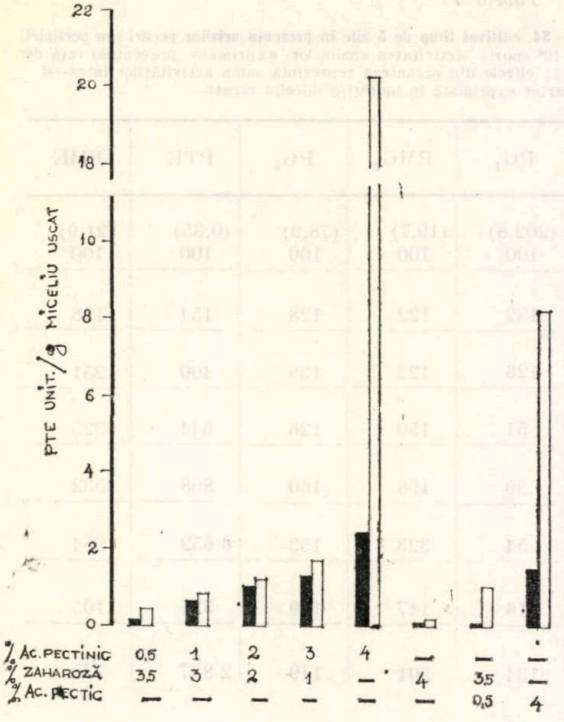


Fig. 1. — Activitatea PTE din culturile de A. niger ICA-34, în vîrstă de 5 zile, obținute în prezența și absența acizilor pectinici și pectici.

■ activitatea intracelulară; ▭ activitatea extracelulară.

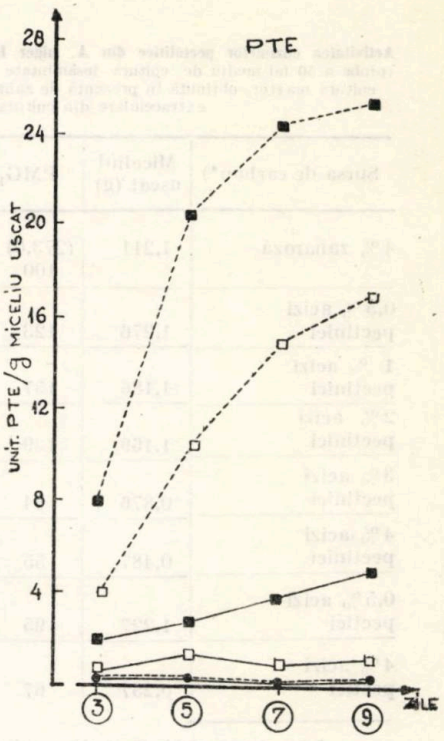


Fig. 2. — Activitatea PTE din culturile de A. niger ICA-34, obținute în prezența unor glucide, în funcție de vîrsta culturilor.

■ – ■ acizi pectinici; □ – □ acizi pectici; ● – ● zaharoză; —— activitatea intracelulară și – – – activitatea extracelulară

acestea după cum rezultă din datele prezentate, producția unor astfel de enzime este stimulată de acizii pectici; este însă adevărat că activitatea acestor enzime obținute în prezența acizilor pectici este în general mai mică decît a culturilor dezvoltate pe acizi pectinici. Cu alte cuvinte, acizii pectici care nu sînt adevăratul substrat pentru enzimele de felul PME și PTE sau a PMG, pot acționa ca inductori sau pot stimula producția acestor enzime.

Ca și în cazul culturilor de A. niger obținute în prezența unor glucide neuronidice, după cum am arătat în altă lucrare (5), dacă avem în vedere raportul enzime pectolitice intracelulare/enzime pectolitice extracelulare pentru probele cultivate pe mediile care conțin glucide uronidice, în general acest raport este în favoarea enzimelor pectolitice extracelulare. Deci, substanțele pectice folosite ca principală sursă de carbon, în general vorbind nu numai că stimulează producerea PG și PMG (5) sau induc PTE și PME ci totodată determină în mare măsură eliberarea sau „secreția" lor extracelulară.

Rezultatele publicate anterior (5) (11), ca și cele prezentate mai sus arată că atît producția de miceliu cît și biosinteza enzimelor pectolitice

în culturile de A. niger depind în mare măsură de glucidele folosite în mediile de cultură ca principale surse energetice şi de carbon. O bună sau slabă creştere şi dezvoltare a miceliului nu poate fi corelată cu acti-

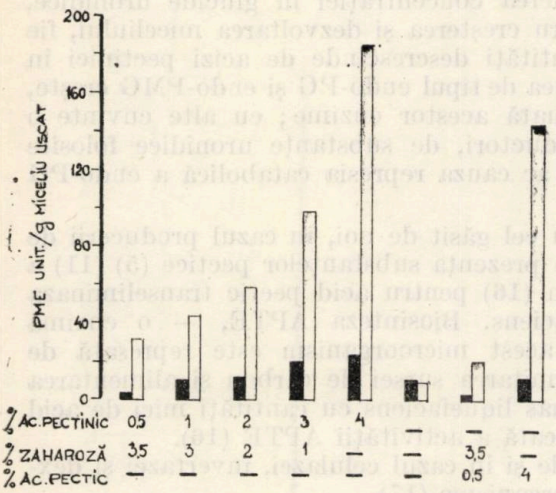


Fig. 3. — Activitatea PME din culturile de A. niger ICA-34, în vîrstă de 5 zile, obţinute în prezenţa şi absenţa acizilor pectinici şi pectici.

■ activitatea intracelulară; □ activitatea extracelulară.

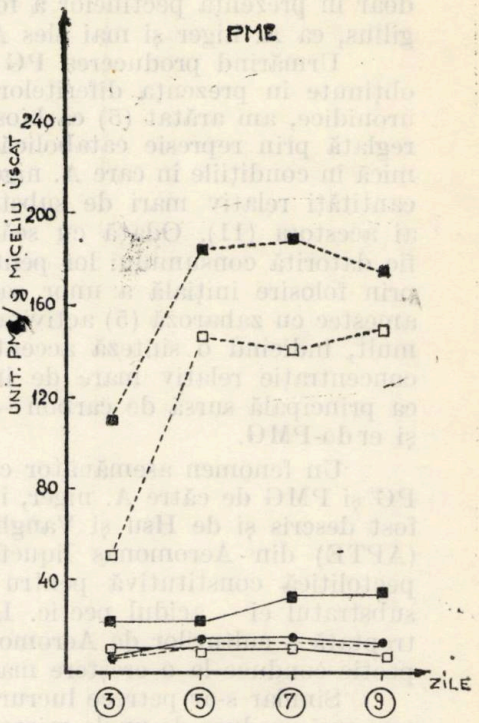


Fig. 4. — Activitatea PME din culturile de A. niger ICA-34, obţinute în prezenţa unor glucide, în funcţie de vîrsta culturilor.

■ – ■ acizi pectinici □ – □ acizi pectici ● – ● zaharoză; —— activitatea intracelulară; – – – activitatea extracelulară.

vitatea pectolitică mare sau mică; mai mult chiar eficienţa glucidelor folosite nu se răsfrînge numai asupra cantităţii de miceliu sau enzime produse, ci şi asupra felului sau tipului de enzime pectolitice sintetizate.

Am arătat anterior (5) că în prezenţa glucozei fructozei maltozei sau zaharozei se obţine practic aceeaşi cantitate de miceliu însă activitatea PG şi PMG intra- şi extracelulară este foarte diferită; în prezenţa lactozei se produce o cantitate relativ mică de miceliu dar biosinteza PG şi PMG este mult accentuată faţă de cea obţinută pe medii care conţin alte glucide neuronidice, sau chiar uronidice (5).

În prezenţa glucidelor neuronidice, A. niger ICA-34 produce cantităţi variabile, dar apreciabile de PG şi PMG (5); nu sintetizează, însă, în aceste condiţii decît cantităţi extrem de mici, — aproape nesesizabile —, de PTE şi PME. Astfel de enzime sînt însă produse de acestă susă în prezenţa substanţelor pectice.

Biosinteza relativ accentuată a PTE și PME în prezența substanțelor pectice și practic aproape anularea ei în asbența pectinelor, indică natura inductivă a acestor enzime pentru A. niger. Natura inductivă a PME produsă de A. niger a fost arătată și de alți autori (2) (15), iar sinteza PTE doar în prezența pectinelor a fost stabilită pentru unele specii de Aspergillus, ca A. niger și mai ales A. fonsecaeus (8).

Urmărind producerea PG și PMG în culturile de A. niger ICA-34 obținute în prezența diferitelor surse de carbon, glucide neuronidice și uronidice, am arătat (5) că biosinteza endo-PG și endo-PMG pare să fie reglată prin represie catabolică; activitatea acestor enzime este relativ mică în condițiile în care A. niger este obligat să crească în prezența unor cantități relativ mari de substanțe pectice sau produși de degradare ai acestora (11). Odată cu scăderea concentrației în glucide uronidice, fie datorită consumului lor pentru creșterea și dezvoltarea miceliului, fie prin folosire inițială a unor cantități descrescînde de acizi pectinici în amestec cu zaharoză (5) activitatea de tipul endo-PG și endo-PMG crește, mult, indicînd o sinteză accentuată acestor enzime; cu alte cuvinte o concentrație relativ mare de inductori, de substanțe uronidice folosite ca principală sursă de carbon — ar cauza represia catabolică a endo-PG și endo-PMG.

Un fenomen asemănător cu cel găsit de noi, în cazul producerii de PG și PMG de către A. niger, în prezența substanțelor pectice (5) (11) a fost descris și de Hsu și Vanghn (16) pentru acid pectic transeliminaza (APTE) din Aeromonas liquefaciens. Biosinteza APTE, — o enzimă pectolitică constitutivă pentru acest microorganism este represată de substratul ei — acidul pectic. Limitarea sursei de carbon și alimentarea treptată a culturilor de Aeromonas liquefaciens cu cantități mici de acid pectic conduce la o creștere marcată a activității APTE (16).

Similar s-ar petrece lucrurile și în cazul celulazei, invertazei și dextranazei produse de unele microorganisme (17).

Printr-un mecanism diferit de cel care intervine în reglarea sintezei endo-PG și endo-PMG pare să fie reglată producția de PTE și PME în culturile de A. niger. Din rezultatele prezentate reiese că activitatea acestor enzime este maximă în culturile în care principala sursă de carbon este alcătuită numai din acizii pectinici și pectici, și scade odată cu scăderea substanțelor pectice, respectiv creșterea cantității de zaharoză din mediile de cultură.

Zaharoza, față de acizii pectinici și pectici, este mult mai ușor catabolizată de către A. niger. Produșii de catabolizare ai zaharozei ar represa deci sinteza PTE și PME din culturile de A. niger ICA-34, obținute pe medii ce conțin această sursă de carbon în amestec cu inductorii enzimelor — acizi pectinici și pectici. Zucker și Haukin (18) au arătat că în reglarea sintezei APTE din Erwinia carotovora nu intervine represia catabolică. Această enzimă este însă de natură constitutivă pentru Erwinia carotovora — deosebindu-se în acest sens de PTE din A. niger care este inductivă.

S-ar părea deci că, reglarea biosintezei enzimelor pectolitice în culturile de A. niger, ca și în culturile altor microorganisme se realizează prin „jocul armonios" al inducției și represiei catabolice dependente în mare măsură de compoziția chimică a mediilor de cultură, în special de sursele energetice și de carbon folosite. Astfel, prezența inductorilor, —

a substanţelor uronidice în mediile de cultură determină sau stimulează sinteza diferitelor enzime pectolitice inductive sau constitutive, iar cantitatea acestora, produsă la un moment dat, depinde de intervenţia proceselor de represie catabolică. Represia catabolică a sintezei enzimelor pectolitice s-ar produce însă diferit în cazul enzimelor constitutive — de felul PG şi PMG, care ar fi represate prin concentraţiile relativ mari ale produşilor de catabolizare a însăşi substratelor acestor enzime (5) (11), în timp ce represia producţiei de enzime inductive — de felul PTE şi PME, s-ar realiza prin produşii de catabolizare a unei surse de carbon uşor metabolizate, ca de ex. o serie de glucide neuronidice.

CONCLUZII

1. — Producţia de diferite enzime pectolitice ca şi creşterea şi dezvoltarea miceliului de A. niger ICA-34 este dependentă şi influenţată de compoziţia mediului de cultură.

2. — A. niger. ICA-34 produce PG şi PMG ca enzime constitutive iar PTE şi PME ca enzime inductive.

3. — Prezenţa substanţelor pectice în mediile de cultură determină sau stimulează biosinteza diferitelor enzime pectolitice inductive şi constitutive, iar cantitatea acestora depinde de intervenţia proceselor de represie catabolică.

4. — Represia catabolică a enzimelor pectolitice inductive, PTE şi PME s-ar realiza prin produşii de catabolizare ai unei surse de carbon uşor metabolizată, ca de ex. glucide neuronidice.

Prezentat la redacţie la 30 decembrie 1976

Institutul de ştiinţe biologice — Bucureşti
Spl. Independenţei nr. 296

PECTOLYTIC ENZYMES OF ASPERGILLUS NIGER. V. THE PRODUCTION OF PECTOLYTIC ENZYMES IN THE PRESENCE OF PECTIC SUBSTANCES

SUMMARY

Following the production of pectolytic enzymes (PG, PMG, PTE and PME) in the cultures of A. niger ICA-34 in the presence of various amount of pectinic and pectic acids, PG and PMG were found to be constitutive enzymes, whereas PTE and PME are inducible. The presence of pectins in the liquid culture triggers and enhances the biosynthesis of inducible and constitutive pectolytic enzymes, respectively; the amount of enzyme, produced depends on the action of the catabolic repression processes. The catabolic repression of PTE and PME may be triggered by the degradation products of a rapid carbon source such as nonuronidic sugars.

BIBLIOGRAFIE

1. R. Tuttobello, P. J. Mill, Biochem. J. *79*, 51 (1961).
2. P. Kontio, C. A. *46*, 10474 b (1952).
3. L. Nyeste, J. Hallo, Die Nahrung *6*, 348 (1962).
4. W. W. Reid, *Preparation, properties and assay of pectin degrading enzimes in Production and Application of Enzyme Preparation in Food Manufacture*. Soc. Chem. ind. (1961), London (35 — 47)
5. S. Vasu, St. cerc. biochim., *1*, 71 (1963).
6. I. S. Maximova, A. A. Martakov, B. A. *48* (*21*), 108190 (1967).
7. A. H. J. Cole, R. K. S. Wood, Ann. Bot. (London), *34*, 211 (1970).
8. R. D. Edstrom, H. J. Phaff, J. Biol. Chem. *239*, 2403 (1964).
9. H. J. Phafff, Arch. Biochem., *13*, 67 (1947).
10. S. C. Gupta, Ann. Botany (London) *20*, 179 (1956).
11. S. Vasu, Rev. roum. Biochim., *4*, 219 (1967).
12. S. Vasu. Rev. roum. Biochim., *4*, 67 (1967).
13. P. Albersheim, U. Killias, Arch. Biochem. Biophys., *97*, 107 (1962).
14. Z. I. Kertesz, *Pectic Enzymes*, în S. P. Colwick N. O. Kaplan, *Methods in enzymology*. Acad. Press Inc., New York (1955), *1*, 159.
15. E. Gauman, E. Bohni, Holv. chim. Acta *30*, 1591 (1947).
16. E. J. Hsu, R. H. Vanghn, J. Bacteriol, *98*, 172 (1969).
17. E. T. Reese, J. E. Lola, F. W. Parrish, J. Bacteriol, *100*, 1151 (1969).
18. M. Zucker, L. Haukin, J. Bacteriol., *104*, 13 (1970).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 95 — 107

REFERAT GENERAL

STRUCTURA ŞI ROLUL COMPONENTULUI GLUCIDIC DIN IMUNOGLOBULINE

ELENA GANEA şi GRUIA IONESCU

I. COMPONENTUL GLUCIDIC AL IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele sînt glicoproteine serice cu funcţie de anticorpi, proporţia de carbohidrat în moleculă fiind caracteristică principalelor clase (Tabela 1).

Tabela 1

Conţinutul în carbohidrat al principalelor clase de imunoglobuline

Clasa de Ig	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
CONCENTRAŢIA în ser (mg/ml)	8—16,8	1,4—4,9	0,5—1,9	0,03—0,4	0,01—0,04 mg/100 ml
CONŢINUTUL în glucide (%)	2,9	7,5	7,7—10,7	12	10,7—12,1

Numeroasele cercetări din ultimul deceniu avînd ca obiectiv studiul componentului glucidic al imunoglobulinelor au arătat eterogenitatea structurii şi poziţiei unităţilor oligozaharidice constitutive, deşi în compoziţia lor intră aceleaşi zaharuri : glucozamina sau galactozamina, manoza, galactoza, fucoza şi acidul sialic. În momentul de faţă, în timp ce asupra sintezei şi structurii componentului glucidic se cunosc o serie de detalii, participarea acestuia la funcţiile biologice ale imunoglobulinelor stîrneşte încă numeroase controverse.

a) Biosinteza unităţilor oligozaharidice din imunoglobuline. Acest proces se petrece în paralel cu sinteza şi cu tranzitul intracelular al lanţurilor L şi H din plasmocitele normale sau din celulele limfoide neoplazice. Date recente obţinute cu ajutorul izotopilor radioactivi (1) (2) (3) susţin ideea ataşării treptate a carbohidratului la proteină în timpul secreţiei intracelulare. Lanţurile L se asamblează conform informaţiei din mARN 9 — 11 S la nivelul polizomilor sedimentabili la 190 S, în timp ce lanţurile H codificate de mARN 16 — 18 S se sintetizează la nivelul polizomilor 270 S. Odată eliberate în celulă, lanţurile uşoare se ataşează la polizomii 270 S asigurînd alături de lanţurile grele asamblarea întregii molecule (4). În această etapă, tot la nivelul polizomilor are loc prin intermediul glicoziltransferazelor ataşarea primelor resturi de carbohidrat : glucozamina, respectiv galactozamina (5). Alte lucrări susţin ideea că adăugarea glucozaminei are loc după trecerea moleculei de imunoglobulină de pe polizomi în lumenul reticulului endoplasmic granular (REG) (6) (7). Stimulul necesar declanşării activităţii glicoziltransferazelor l-ar constitui recunoaş-

terea de către acestea a unor secvențe caracteristice de aminoacizi, de genul Phe-Asn-Ser-Thr sau Tyr-Asn-Thr-Ser, de pe lanțurile polipeptidice. În orice caz la nivelul REG se continuă atașarea de glucozamină și manoză. Pe măsura înaintării moleculelor de imunoglobuline de-a lungul cisternelor reticulului endoplasmatic neted (REN) spre zona Golgi (Fig. 1) se adaugă unități noi de galactoză și fucoză (8).

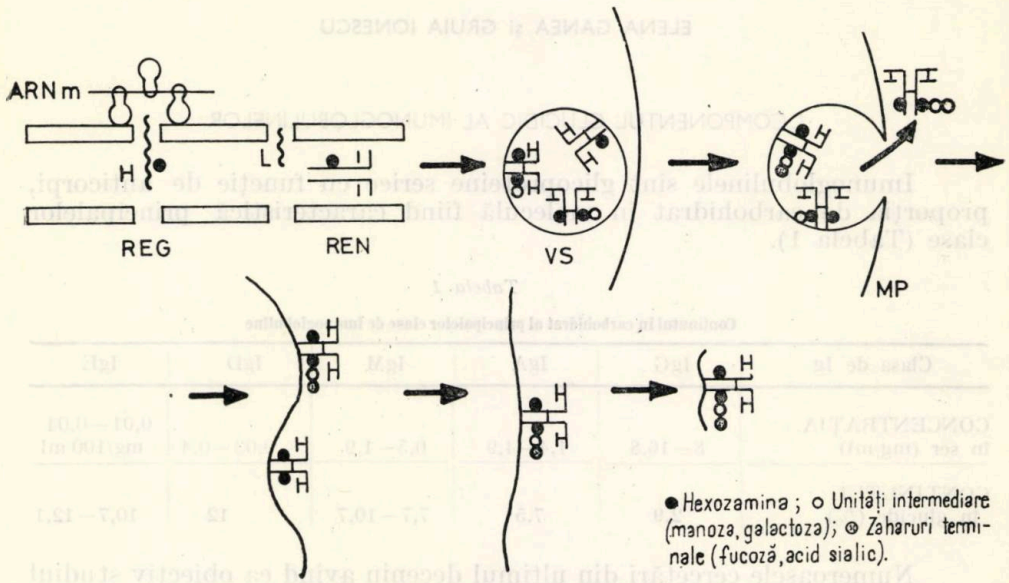


Fig. 1. — Biosinteza unităților oligozaharidice din imunoglobuline.

Din zona Golgi cea mai mare parte din moleculele de imunoglobuline ajung prin intermediul veziculelor de secreție (VS) la nivelul membranei plasmatice (MP). În acest moment are loc atașarea tardivă a unor unități de fucoză și a acidului sialic, fapt care a sugerat ideea rolului acestor zaharuri în secreția imunoglobulinelor.

O parte din imunoglobulinele nou sintetizate sînt secretate la exterior, o altă parte rămîne în „rezervă activă" prinsă de membrane și în fine, o altă fracțiune înlocuiește glicopeptidele de membrană cu funcții receptoare și cu turnover rapid (3).

b) Natura legăturii cu proteina. Atît la imunoglobulinele normale cît și la cele patologice se întîlnesc trei tipuri de legături covalente între proteină și partea glucidică (Fig. 2).

— Legătura N-glicozidică (cea mai răspîndită) între gruparea aminică a asparaginei și oxidrilul semiacetalic al glucozaminei sau galactozaminei.

— Legătura O-glicozidică între oxidrilul treoninei sau serinei și oxidrilul semiacetalic al glucozaminei (9).

— Legătura ester-glicozidică (rar întîlnită) între carboxilul acidului aspartic sau glutamic și oxidrilul semiacetalic al hexozaminei (10).

De multe ori, la baza unităților oligozaharidice stă o structură caracteristică (β, 1-4) di-N-acetyl chitobiozică, formată din două glucoz-

amine acetilate (Fig. 2a). La acestea se ataşează ulterior manoza, galactoz, etc.

c) Poziţia unităţilor oligozaharidice din imunoglobuline. Distribuţia zaharurilor din moleculele de imunoglobuline a fost studiată la două nivele. S-a investigat conţinutul în carbohidraţi al diferitelor fragmente de moleculă sau lanţuri polipeptidice, sau, poziţia precisă a unităţilor oligozaharidice a fost stabilită în timpul studiilor de secvenţă a aminoacizilor. Prin prima metodă a fost examinat conţinutul glucidic al Fab, Fc, $F(ab')_2$ şi al altor mici fragmente produse prin proteoliza imunoglobulinelor. De asemenea, s-a analizat carbohidratul de pe lanţurile grele şi uşoare separate, provenind din imunoglobuline normale sau mielomatoase, din proteine Bence-Jones sau din boala lanţurilor grele. Rezultatele demonstrează că atît la imunoglobuline normale cît şi patologice cea mai mare parte din carbohidrat este localizată pe Fc şi doar o mică parte se asociază cu Fab.

O serie de date semnalează prezenţa carbohidratului pe 15 — 20% din *lanţurile uşoare*, în regiunea variabilă (11). Astfel, largi variaţii ale conţinutului glucidic au fost găsite la proteinele Bence-Jones şi pe lanţurile uşoare din IgG mielomatoase (12). Cercetările lui Edmundson şi colab. (13) au evidenţiat diferenţe în conţinutul de carbohidrat al proteinei Bence-Jones umane şi cel al lanţului uşor λ din IgG mielomatoasă corespunzătoare. La aceasta din urmă, oligozaharidul conţinînd fucoză, GlcNAc, GalNAc şi NGNA apare localizat în regiunea variabilă pe o secvenţă de aminoacizi de genul : Ser-Glu-Asp-Glu-Ala (13).

Lanţurile uşoare k, provenind dintr-o linie tumorală specială, la şoarece, conţineau carbohidrat (hexozamină, hexoză, acid sialic) localizat tot în interiorul regiunii variabile pe o secvenţă de aminoacizi : Ser-Glu-Asp-Ile-Ser (14).

Mihaesco şi Seligman, localizează unităţi oligozaharidice în regiunea variabilă a lanţurilor uşoare k şi λ din IgM umană (15), iar Davie şi Osterland decelează o unitate oligozaharidică în regiunea constantă a lanţului uşor din IgM umană (16).

Cea mai mare parte din carbohidratul imunoglobulinelor a fost găsit însă pe *lanţurile grele*, în porţiunea constantă. Studii pe IgG_1 umană au condus la identificarea pe lanţul greu a unei unităţi oligozaharidice ataşată la Asp din poziţia 297 (numărată de la capătul N-terminal), la jumătatea buclei disulfidice. Secvenţa de aminoacizi din jurul acestui punct (Glu-Tyr-Asp-Ser-Thr) este remarcabil de constantă la animalele aparţinînd la diferite specii examinate pînă în prezent : iepure, cal, porc, maimuţă, cîine, pisică, vacă (17).

Cercetări amănunţite efectuate pe IgG de iepure demonstrează prezenţa mai multor unităţi oligozaharidice pe lanţurile grele. Alături de glucidul ataşat la Asp din poziţia 150 numărată de la capătul C-terminal al fragmentului Fc, Smyth şi Utsumi semnalează în 1967 prezenţa unei unităţi zaharice ce conţinea galactozamină, legată de treonina de pe lanţul greu, în imediata vecinătate a legăturii disulfidice interlanţ (10). Ulterior, Hinrichs şi Smyth (18) şi Fanger şi Smyth (19), confirmă aceste rezultate. În plus, ei identifică la iepure două subpopulaţii de IgG : una

cu patru unităţi oligozaharidice (două pe fiecare lanţ H) şi alta cu cinci unităţi oligozaharidice (două şi respectiv trei pe fiecare lanţ H).

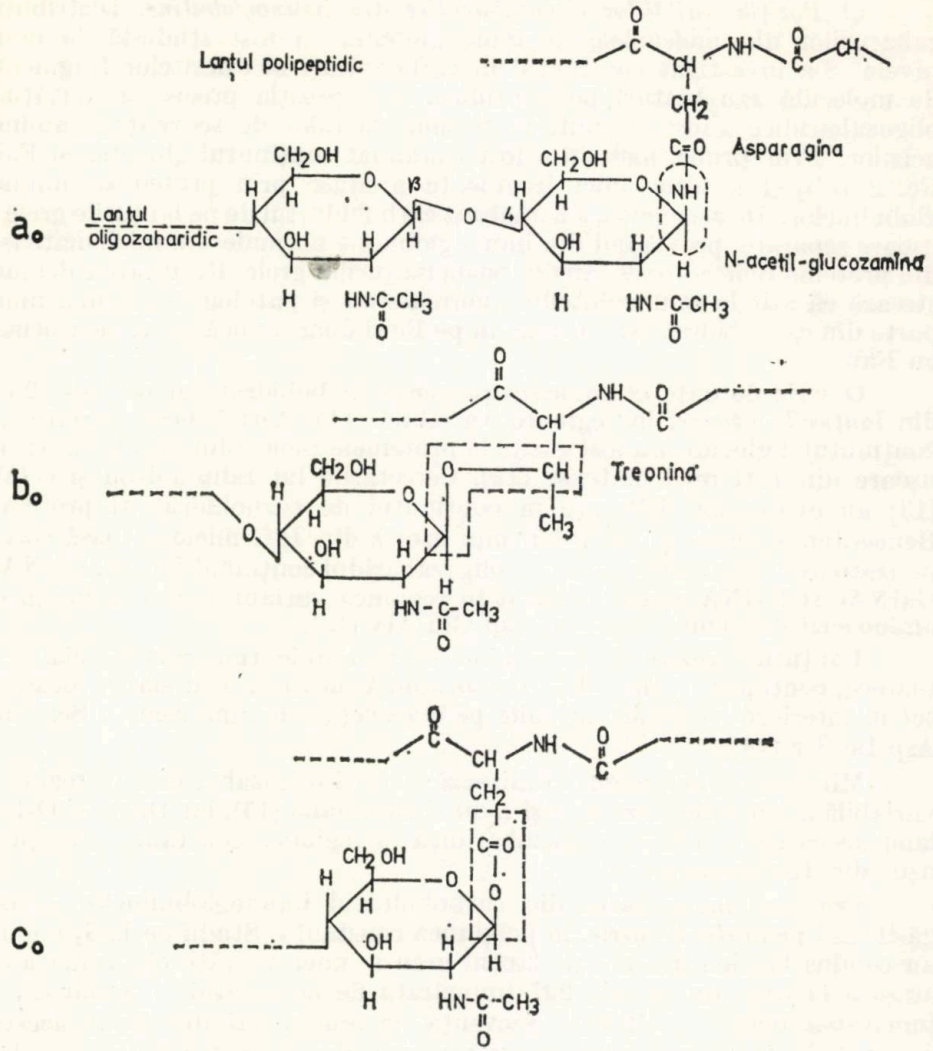


Fig. 2. — Tipuri de legături între carbohidrat şi proteină:

a. Legătură N-glicozidică; *b*. Legătură O-glicozidică; *c*. Legătură ester-glicozidică.

Subpopulaţia de IgG cu cinci unităţi oligozaharidice reprezenta cca 80% din IgG seric şi putea fi recunoscută după conţinutul în galactozamină caracteristic unităţii asimetrice (C_2). Modelul propus de aceşti autori este reprezentat în Fig. 3.

Ataşarea unităţii asimetrice are loc intracelular după legarea lanţurilor grele prin intermediul punţilor disulfidice.

S-a emis ipoteza că glicozil-transferaza implicată în legarea unităţii C_2 ar recunoaşte numai o regiune simetrică, fără carbohidrat, adiacentă

legăturii S—S. Prin ataşarea C_2, regiunea vecină legăturii disulfidice devine asimetrică, enzima pierzîndu-şi afinitatea pentru noul substrat.

Majoritatea autorilor au localizat componentul glucidic din imunoglobuline în porţiunea constantă a lanţurilor grele. Totuşi Press şi Hogg

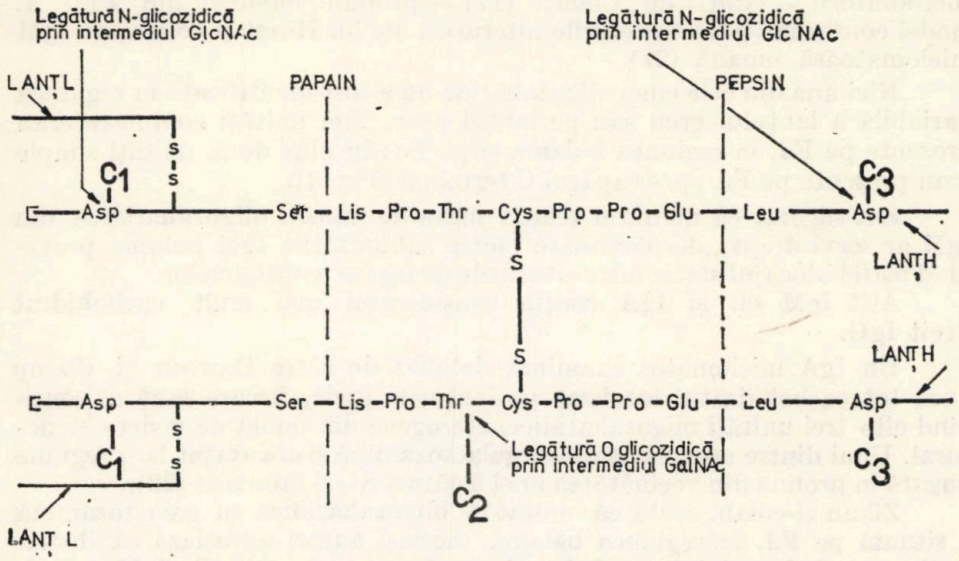


Fig. 3. — Localizarea unităţilor oligozaharidice pe IgG de iepure.
(după FANGER şi SMYTH, 1972)

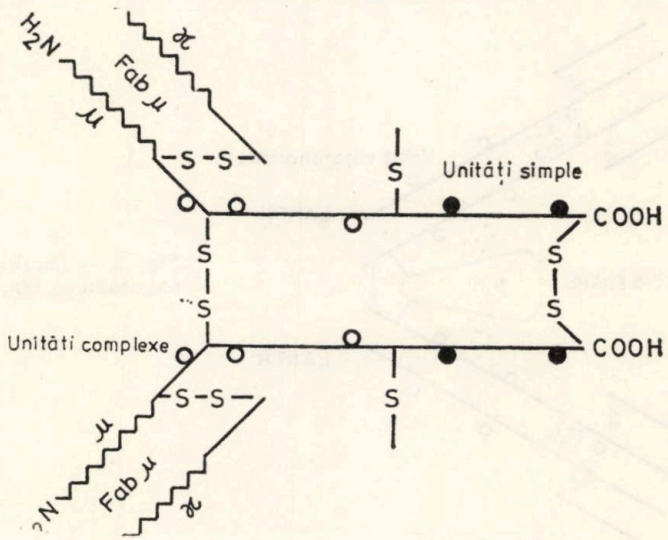


Fig. 4. — Localizarea unităţilor oligozaharidice pe IgMs uman.
(după SHIMIZU et. al. 1971)

— citaţi de Clamp (17) — decelează carbohidrat şi în regiunea variabilă a lanţurilor grele din IgG şi IgA.

Carbohidratul din IgM este localizat tot pe lanţul greu care ar conţine patru, respectiv cinci unităţi oligozaharidice pentru lanţurile μ mai bogate în carbohidrat (20).

În privinţa poziţiei acestor unităţi pe lanţurile grele, Shimizu şi colaboratorii — citaţi de Clamp (17) — propun modelul din Fig. 4, model confirmat şi de cercetările ulterioare ale lui Hurst şi colab., pe IgM mielomatoasă umană (21).

Nici una din cele cinci oligozaharide nu a fost identificată în regiunea variabilă a lanţului greu sau pe lanţul uşor. Trei unităţi complexe erau prezente pe Fd, în regiunea balama şi pe Fc; în plus două unităţi simple erau prezente pe Fc, spre capătul C terminal (Fig. 4).

S-a sugerat că numărul relativ mare de unităţi oligozaharidice din IgM ar servi drept „despărţitoare" între subunităţile IgM polimer prevenind astfel blocajul steric între situsurile de legare a antigenelor.

Atît IgM cît şi IgA conţin considerabil mai mult carbohidrat decît IgG.

Un IgA mielomatos examinat detaliat de către Dawson şi Clamp avea tot carbohidratul localizat pe lanţurile grele, fiecare lanţ α conţinînd cîte trei unităţi oligozaharidice, eterogene din punct de vedere structural. Unul dintre acestea conţinea galactozamină şi era ataşat la o regiune bogată în prolină din vecinătatea unei legături S—S interlanţ (22).

Zikan şi colab. arată că unitatea oligozaharidică cu galactozamină e situată pe Fd, în regiunea balama. Aceiaşi autori apreciază că distribuţia carbohidratului de pe IgA e similară cu cea de pe IgG, IgM şi IgD, fragmentul Fc fiind cel mai bogat în glucide (23).

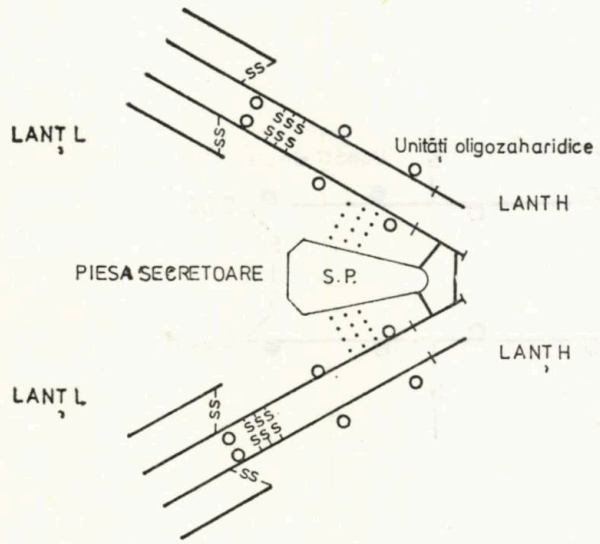


Fig. 5. — Localizarea carbohidratului pe IgA secretor 11S.

IgA secretor 11 S (Fig. 5) — conţine pe lîngă cele două unităţi monomere şi o piesă secretoare de natură glicoproteică (15% glucide) cu greutate moleculară 58 000, legată covalent şi necovalent de porţiunile Fc ale unităţilor monomere.

Studii efectuate pe IgD de două echipe (Perry şi Milstein şi Spiegelberg şi colab.) — citaţi de Clamp (17) — identifică cel puţin trei oligozaharide prezente pe fiecare lanţ δ : unul conţinînd GalNAc pe Fd şi două conţinînd GlcNAc pe Fc.

Asupra poziţiei carbohidratului în molecula de IgE (12% glucide) datele existente sînt foarte sărace.

d) *Structura unităţilor oligozaharidice din imunoglobuline.* Studiul structurii exacte a unităţilor oligozaharidice a întîmpinat dificultăţi serioase întrucît în procesul scindării moleculelor de imunoglobuline sau a separării lanţurilor constitutive prin hidroliză enzimatică şi chimică, o parte din zaharuri sînt distruse.

În plus, nu au putut fi obţinute pînă acum oligozaharide complete ca atare, ci numai glicopeptide, legătura dintre partea glucidică şi proteică dovedindu-se a fi foarte puternică.

Aceste fapte limitează şi interpretarea corectă a rolului părţii carbohidrat din imunoglobuline, de vreme ce nu pot fi obţinute preparate complet libere de unităţi glucidice.

Rezultate bune în studiul structurii şi rolului componentului glucidic au fost relatate recent ca urmare a utilizării unor glicozidaze specifice, ca atare, sau combinate cu unele metode chimice (oxidare cu periodat, acetilare, metilare, reducere etc.) care fac posibilă decelarea grupărilor libere de cele substituite.

Astfel, deoarece cantităţi însemnate de acid N-acetil neuraminic (NANA), fucoză, şi N-acetil glucozamină au fost obţinute prin scindare cu exoglicozidazele specifice, s-a dedus că poziţia lor în oligozaharid este terminală (24) (25).

Eliberarea galactozei a fost uşurată prin îndepărtarea NANA, GlcNAc şi a fucozei, demonstrînd poziţia sa intermediară.

Manoza este localizată în „miezul" oligozaharidelor, la fel ca şi glucozamina respectiv galactozamina, acestea din urmă fiind implicate şi în legătura carbohidrat-proteină.

În general structurile raportate de diferiţi cercetători corespund ordinei de ataşare a monozaharidelor la proteină în timpul biosintezei. Între monozaharide se stabilesc legături cu configuraţii α(Fuc-Man ; Gal-NANA etc.) sau β (Gal-GlcNAc ; GlcNAc-GlcNAc etc.).

Majoritatea investigaţiilor demonstrează marea eterogenitate structurală a oligozaharidelor din imunoglobuline, deşi în compoziţia lor intră aceleaşi zaharuri. Proporţiile ce se stabilesc între aceste zaharuri variază cu specia, cu individul, cu clasa şi cu subclasa de imunoglobuline.

Astfel studiul carbohidratului din imunoglobulinele peştilor, reptilelor, păsărilor şi mamiferelor a arătat conţinutul lor comun în manoză, galactoză, glucozamină şi NANA. Fucoza a fost prezentă în cantităţi mici la toate speciile, cu cîteva excepţii (IgM la gîscă şi la pisica de mare) unde a lipsit de tot (26). Suma resturilor de fucoză şi NANA de pe lanţurile grele s-a găsit a fi aproximativ egală cu 1, ceea ce a sugerat posibilitatea substituirii reciproce a acestor zaharuri în timpul sintezei imunoglobulinelor.

Un alt aspect interesant s-a dovedit a fi raportul Man/Gal. Acest raport este supraunitar la imunoglobulinele păsărilor şi mamiferelor (în special), la celelalte clase fiind subunitar sau cel mult egal cu 1(26).

Unităţile oligozaharidice de pe lanţurile polipeptidice ale imunoglobulinelor au fost în mod artificial clasificate în unităţi simple, formate din 3 — 5 monozaharide dispuse liniar şi unităţi complexe, formate din numeroase monozaharide dispuse în structuri catenare înalt ramificate. Două exemple sînt redate în figura 6.

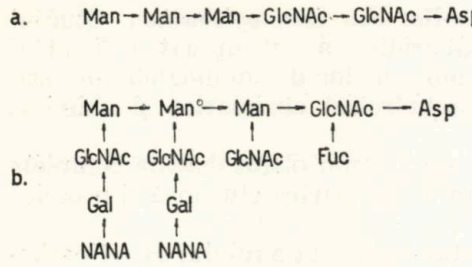


Fig. 6. — Unităţi oligozaharidice simple şi complexe din Ig umane :

a. Unitate oligozaharidică simplă de tip C_B ; *b*. Unitate oligozaharidică complexă de tip C_A (după CLAMP şi JOHNSON 1972).

Raportată la diferitele clase de imunoglobuline, structura unităţilor oligozaharidice suferă variaţii evidente. Astfel, cercetările lui Fanger şi Smyth evidenţiază următoarea compoziţie în monozaharide a unităţilor C_1, C_2, C_3, de pe IgG de iepure (Fig. 3).

C_1 : 2 GlcN, 1 Man, 2 Gal

C_2 : 1 GalN, 1 Gal, 1 — 2 NANA

C_3 : 5 GlcN, 5 Man, 2 Gal, 1 Fuc, 1 NANA

Studii pe IgM mielomatos uman efectuate de Spragg şi Clamp, (20), Johnson şi Clamp (27), Hurst şi colab. (21), aduc precizări asupra compoziţiei celor cinci glicopeptide izolate din lanţul μ.

Trei dintre acestea (C_1, C_2, C_3) s-au dovedit a avea o structură complexă, iar două (C_4, C_5) o structură simplă :

C_1 : 2 GlcN, 3 Man, 1 Gal, 1 Fuc, 1 — 2 NANA

C_2 : 3 GlcN, 6 — 7 Man, 2 Gal, 1 Fuc, 1 — 2 NANA

C_3 : 2 $GlcN$, 2 Man, 1 Gal, 0 Fuc, 1 — 2 NANA

C_4 : 1 — 2 GlcN, 3 — 4 Man.

C_5

Ca şi în cazul IgM, formele polimere de IgA amestecate cu cele monomere îngreunează lămurirea structurii părţii glucidice.

Cercetări pe IgA monomer (8,7% carbohidrat) stabilesc următoarele proporţii între monozaharidele de pe o moleculă de IgA :

2 Fuc, 14 — 15 Man, 2 — 13 Gal, 12 — 13 GlcN, 6 GalN, 5 NANA

Deşi nu s-a stabilit precis compoziţia oligozaharidelor din molecula de IgA, Dawson şi Clamp, 1968, identifică pe lanţul greu α o unitate complexă de tip C_A, întîlnită şi pe moleculele de IgG şi IgM (22) :

C_A : 0 — 1 Fuc, 3 Man, 1 — 2 Gal, 3 — 4 GlcNAc, 0 — 3 NANA

Studii asupra compoziţiei în monozaharide a IgD (Perry şi Milstein, Spiegelberg şi colab.) — citaţi de Clamp (17) — concordă în aprecierea unui conţinut scăzut în fucoză (1 rest per moleculă) şi crescut în GalNAc (11 — 13 resturi per moleculă) şi NANA (15 — 19 resturi per moleculă).

Investigaţiile de mai sus privind poziţia şi structura componentului glucidic au fost făcute în vederea elucidării influenţei acestei fracţii moleculare asupra proprietăţilor fizico-chimice şi biologice ale imunoglobulinelor.

II. ROLUL COMPONENTULUI GLUCIDIC DIN IMUNOGLOBULINE

De mai bine de un deceniu componentului glucidic din imunoglobuline i se atribuie cele mai diferite funcţii. Cu excepţia influenţei carbohidratului asupra solubilităţii imunoglobulinei, toate celelalte implicaţii ale sale în proprietăţile moleculei sînt viu disputate. Redăm mai jos principalele roluri potenţiale ale oligozaharidelor din imunoglobuline.

a) *Rolul carbohidratului în secreţia şi polimerizarea imunoglobulinei.* Analiza lanţurilor grele din IgM şi IgA mielomatoase de la şoarece făcută de Shubert, în 1970, arată că în timp ce lanţurile grele conţinînd carbohidrat pot fi identificate atît în interiorul celulei cît şi în afara ei, în imunoglobulina secretată, lanţurile grele fără carbohidrat pot fi decelate numai intracelular. Aceste date duc la ipoteza că secreţia imunoglobulinei ar fi o consecinţă a recunoaşterii de către sistemul de transport extracelular a carbohidratului din molecula de imunoglobulină sau a unui determinant conformaţional, dependent de prezenţa acestuia (7). Descoperirea unor mieloame umane rare care secretă fragmente de lanţ greu conţinînd carbohidrat şi asemănătoare cu fragmentul Fc din imunoglobuline, pare să susţină această ipoteză.

Faptul că secreţia şi polimerizarea imunoglobulinelor se petrec aproape concomitent cu ataşarea ultimelor zaharuri (fucoză, acid sialic) a sugerat ipoteza că aceste procese ar fi corelate (28) (2). Ulterior, Melchers şi Andersson demonstrează că inhibarea cu 2-deoxi-D-glucoză a ataşării fucozei şi acidului sialic la moleculele de IgG din celulele tumorale plasmocitare de şoarece, nu afectează secreţia extracelulară a acestor molecule (3).

Un alt argument împotriva rolului hidraţilor de carbon în transportul imunoglobulinelor la exterior ar fi faptul că în general celulele mielomatoase secretă extracelular pe lîngă imunoglobulinele complete şi lanţuri uşoare libere care nu conţin carbohidrat.

Totuşi şi aceste date sînt discutabile de cînd, cu ajutorul unor metode sensibile (gaz-cromatografie), s-au decelat mici cantităţi de zahăr chiar pe lanţurile uşoare mielomatoase (11).

În privinţa secreţiei formelor polimere, Parkhouse şi Della Corte apreciază că factorul critic în controlul polimerizării IgM şi IgA îl constituie prezenţa lanţului J (29). Atît IgM cît şi IgA polimere pot fi preparate „in vitro" pornindu-se de la subunităţi obţinute prin reducerea formelor polimere, sau de la forme monomere secretate, dar numai în prezenţa lanţurilor J şi a unei enzime, tiol-proteindisulfid oxido-reductaza (TPO) ce catalizează schimbul disulfidic (30).

b) *Rolul carbohidratului în transportul transplacentar al imunoglobulinelor.* Şi în această privinţă părerile sînt împărţite. Hinrichs şi Smyth au explicat capacitatea moleculelor de IgG de a traversa bariera placentară în contrast cu IgA şi IgM, prin conţinutul sporit în hidraţi de carbon al acestora faţă de IgG (18). Aceiaşi autori injectează un iepure gravid cu un amestec de: IgG fără oligozaharidul C_2 şi IgG cu oligozaharidul C_2 marcat cu ^{125}I. După parturiţie s-a luat sînge de la mamă şi de la pui, constatîndu-se în sîngele mamei o cantitate de IgG cu oligozaharid C_2 mult mai mare decît în sîngele puiului.

Pe de altă parte, Miller, scindînd carbohidratul din IgG cu ajutorul unor glicozidaze și injectînd la șobolan în paralel cu IgG nativ, nu obține nici o diferență în raportul maternal/fetal al celor două populații de IgG(31).

c) *Influența carbohidratului asupra unor proprietăți fizico-chimice ale moleculei de imunoglobuline.*

1. *Migrarea electroforetică.* Lanțuri grele mielomatoase cu și fără carbohidrat găsite extracelular și intracelular la șoarece (7), prezintă o mobilitate electroforetică deosebită, cele fără carbohidrat migrînd mai repede pe geluri de acrilamidă-SDS. Diferențele în vitezele de migrare ale lanțurilor γ, α și μ sînt de asemenea atribuite cantităților sporite de carbohidrat de pe ultimele două.

Desigur că nu numai procentul în glucide ci și calitatea lor influențează migrarea. Astfel, grupările carboxilice libere din acidul sialic conferă glicoproteinei din care face parte un caracter acid reducînd totodată viteza de migrare (32).

Pe de altă parte, Kleine și colab., 1975, nu remarcă nici o deosebire între modelele disc-electroforetice ale IgM uman nativ și ale IgM parțial lipsit de carbohidrat prin scindare enzimatică cu un amestec de glicozidaze (30).

2. *Solubilitatea.* Partea glucidică este implicată în sporirea solubilității moleculelor de imunoglobuline. Kleine și colab. demonstrează că hidroliza enzimatică parțială a lanțurilor carbohidrate afectează structura cuaternară a moleculei de IgM 19S, determinînd scăderea solubilității acesteia și favorizînd agregarea moleculelor. În acest context, zaharurilor hidrofile de pe suprafața moleculei le revine rolul de a spori solubilitatea proteinei și de a contribui prin legături de H sau prin alte legături necovalente la menținerea structurii pentamerice a IgM, în vederea stabilizării ei ulterioare prin punți disulfidice (30).

Studii pe tema crioglobulinelor arată că îndepărtarea acidului sialic (NANA) din IgG serică, modifică raporturile dintre aceasta și celelalte globuline (IgM 19S în special) determinînd precipitarea la rece a amestecului : IgM 19S — IgG fără acid sialic) (33).

3. *Rezistența la proteoliză.* Un alt aspect abordat de numeroși cercetători este implicarea carbohidratului în rezistența la proteoliză a imunoglobulinelor.

Analize efectuate pe IgA secretor atribuie piesei secretoare și chiar lanțului J rezistența acestei imunoglobuline la acțiunea pepsinei, tripsinei, chimotripsinei și a lichidului duodenal total. Ganea și Motaș constată că desializarea IgA secretor afectează numai piesa secretoare în privința rezistenței la proteoliză, fără a avea un efect evident asupra dimerului (34).

Cercetări efectuate pe IgG de iepure demonstrează că lanțul greu, purtător al oligozaharidului C_2 este mai rezistent la scindarea cu papaină decît lanțul greu vecin (fără C_2), (19), iar legătura peptidică dintre tirozină și asparagină purtătoare de carbohidrat (C_2) nu este hidrolizată nici de pepsină și nici de chimotripsină (17).

4. *Durata vieții medii.* Stabilitatea structurală a IgG conținînd oligozaharidul C_2 este ilustrată și de durata vieții medii (rata de clearance) a acestui tip — 4, 9 zile, în raport cu IgG fără C_2 — 3,3 zile.

d) *Contribuția carbohidratului la antigenicitatea imunoglobulinei.* Puține investigații au fost făcute asupra contribuției pe care o aduc unitățile oligozaharidice la antigenicitatea imunoglobulinelor.

Pentru a decela influența carbohidratului, Clamp și Verrier Jones, au făcut o serie de studii pe un sistem IgA mielomatoasă umană — ser de iepure anti IgA, în care contribuția unităților oligozaharidice la antigenicitate s-a evaluat prin inhibarea de către glicopeptidele izolate din IgA a hemaglutinării pasive și a anafilaxiei cutanate. Rezultatele au arătat că unul dintre glicopeptidele-haptenă utilizate care conținea Fuc, Man, Gal, GalNAc, NANA și Asp a avut o acțiune inhibitoare semnificativă în toate sistemele de testare. Determinantul unic antigenic a fost apreciat ca rezultînd din interacțiunea covalentă a unității oligozaharidice cu segmentul peptidic adiacent (35).

Experiențele lui Melchers și Sela (36) și Miller (24) conduc la rezultate contrarii. Astfel, glicopeptide din IgG mielomatoasă de șoarece nu sînt imunogene la iepure, iar anticorpii contra lanțului H nu reacționează cu aceste glicopeptide.

Rezultatele nu elimină însă posibilitatea ca unitățile oligozaharidice să-și modifice conformația prin interacțiunea cu lanțurile H, grupările determinante specifice astfel formate putînd fi total deosebite antigenic de cele din oligozaharidele izolate (efectul de carrier).

Același Miller, 1971, constată că glicopeptidele izolate din IgA și IgM umane determină un răspuns imun mai pronunțat decît glicopeptidele din IgG, contribuind ca haptene la antigenicitatea lanțurilor grele α și μ (24). Diferențele de răspuns imun dintre glicopeptidele din IgA, IgM și cele din IgG sînt atribuite cantităților sporite de carbohidrat din primele două.

Diferențe în răspunsul imun se constată și la inocularea glicopeptidelor din imunoglobuline umane și a celor din imunoglobuline de șoarece, deosebite atît în privința încărcăturii electrice, a structurii cît și în privința secvenței de aminoacizi din lanțul greu la care se atașează.

Alte studii au arătat o reactivitate încrucișată variabilă între glicopeptidele aceleiași imunoglobuline, ale imunoglobulinei din aceeași clasă sau chiar din clase diferite, fapt ce sugerează existența unor grupări determinante de specificitate comune.

e) *Influența carbohidratului asupra proprietăților biologice ale imunoglobulinelor.* Implicarea carbohidratului în proprietățile biologice ale imunoglobulinelor nu este încă lămurită datorită imposibilității îndepărtării complete a unităților oligozaharidice. În acest context folosirea exoglicozidazelor sau a endoglicozidazelor specifice s-a bucurat de un considerabil interes deși rezultatele obținute nu au fost pe deplin satisfăcătoare (25) (37).

O serie de studii pledează pentru neparticiparea unităților oligozaharidice la principalele proprietăți biologice ale imunoglobulinelor. Astfel, încă din 1959 Porter arată că fragmentele Fab care în general sînt lipsite de carbohidrat își păstrează în întregime afinitatea lor pentru antigen (38). După Smiley și Horton, carbohidratul nu apare implicat în fixarea complementului pe IgG umană și nici în fixarea eterologă tegumentară a IgG (39). Același lucru îl afirmă Tarentino și colab., 1974, cu privire la fixarea complementului pe IgM umană lipsită de oligozaharide neutre (40).

Williams şi colab., tratînd IgG de iepure cu o endoglicozidază din *Diplococcus pneumoniae* nu remarcă modificări apreciabile în aglutinarea, fixarea complementului şi opsonizarea stafilococilor, streptococilor şi a *Escherichiei coli*. În schimb, IgG anti-pneumococică suferea pierderea completă a fixării complementului şi a activităţii opsonizante (37).

Recent, Ionescu şi colab., 1977, confirmă pierderea fixării complementului pe IgG de iepure cu activitate anti-pneumococică, tratată cu un extract brut de glicozidaze pneumococice. Aceiaşi autori constată însă o creştere surprinzătoare a fixării complementului pe IgM de iepure tratată cu acelaşi extract (41).

Tot în favoarea implicării carbohidratului în activitatea biologică a imunoglobulinelor, Howell şi colab. raportează o creştere semnificativă a carbohidratului din IgG de iepure cu activitate anti-DNP, pe parcursul imunizării (42), iar studii recente pe IgM asociază activităţile opsonizantă, chemotactică şi bactericidă ale acestei imunoglobuline cu fragmente din lanţul μ cunoscut pentru conţinutul său sporit în carbohidrat (43) (44).

Dat fiind volumul, eterogenitatea şi aspectul contradictoriu al datelor privind fracţia glucidică din imunoglobuline, lucrarea de faţă încearcă o sistematizare a materialului existent subliniind importanţa relaţiei structură-funcţie.

Cercetări în curs de desfăşurare vor aduce noi precizări pe această temă.

Prezentat la redacţie la 10 decembrie 1976

Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti
Colectivul de proteine
şi
Spitalul clinic Dr. I. Cantacuzino, Bucureşti
Departamentul de hematologie şi imunologie

BIBLIOGRAFIE

1. J. W. Uhr, I. Schenkein, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **66**, *952* (1970).
2. E. Della Corte, R. M. E. Parkhouse, Biochem. J., **136**, *589* (1973).
3. F. Melchers, J. Andersson, Transplant Rev., **14**, *76* (1973).
4. B. A. Askonas, A. R. Williamson, Nature, **211**, *369* (1966).
5. R. M. Swenson, M. Kern, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **59**, *546* (1968).
6. C. Moroz, J. W. Uhr, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **32**, *263* (1967).
7. D. Shubert, J. Mol. Biol., **51**, *287* (1970).
8. F. Melchers, Biochem. J., **125**, *241* (1971).
9. A. Gottschalk, Glycoproteins, Biochim. Biophys. Acta, Library, Amsterdam, **5A**, 470 (1972).
10. D. G. Smyth, S. Utsumi, Nature, **216**, *332* (1967).
11. H. C. Sox, L. Hood, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **66**, *975* (1970).
12. C. A. Abel, H. L. Spiegelberg, H. M. Grey, Biochemistry, **7**, 1271 (1968).
13. A. B. Edmundson, F. A. Sheber, K. R. Ely, N. O. Simonds, N. K. Hutson, J. L. Rossiter, Arch. Bichem. Biophys., **127**, *725* (1968).
14. F. Melchers, E. S. Lennox, M. Facon, Biochem. Biophys. Res. Commun., **24**, *244* (1966).
15. E. Mihaesco, M. Seligmann, J. Exptl. Med., **127**, *431* (1968).
16. J. M. Davie, C. K. Osterland, Immunochemistry, **8**, *303* (1971).
17. J. R. Clamp, I. Johnson, Glycoproteins, Biochim. Biophys. Acta, Library, Amsterdam, **5A**, *612* (1972).
18. W. A. Hinrichs, D. G. Smyth, Immunology, **18**, *759* (1970).
19. M. W. Fanger, D. G. Smyth, Biochem., J., **127**, *757* (1972).

20. B. Spraagg, J. R. Clamp, Biochem., J., **114**, *57* (1969).
21. M. M. Hurst, W. Niedermeyer, J. Zikan, J. C. Benett, J. Immunol., **110**, *840* (1973).
22. G. Dawson, J. R. Clamp, Biochem., J., **107**, *341* (1968).
23. J. Zikan, K. Mestecky, R. Schrohenloher, M. Tomana, Immunochemistry **9**, *1185* (1972).
24. F. Miller, Immunochemistry, **8**, *99* (1971).
25. F. Miller, Immunochemistry, **9**, *217* (1972).
26. R. T. Acton, W. Niedermeyer, J. Immunol., **109**, 371 (1972).
27. I. Johnson, J. R. Clamp, Biochem. J., **123**, *739* (1971).
28. F. Melchers, P. M. Knopf, Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol., **32**, *255* (1967).
29. R. M. E. Parkhouse, E. Della Corte, Biochem. J., **136**, *607* (1973).
30. R. Kleine, F. V. Shmakova, A. Lapuk, G. V. Vikha, E. D. Kaverzneva, Immunochemistry, **12**, *825* (1975).
31. F. Miller, J. Immunol., **107**, *1161* (1971).
32. J. P. Waerman, H. H. Fudenberg, C. Werman, W. J. Mandy, Immunochemistry, **2**, *263* (1965).
33. H. Zinneman, D. Levi, V. Seal, J. Immunol., **100**, *594* (1968).
34. E. Ganea, C. Motaş, Rev. roum. biochim., **1**, *29* (1975).
35. J. R. Clamp, J. Verrier Jones, Clin. Chim. Acta, **21**, **165** (1968).
36. F. Melchers, M. Sela, Immunochemistry, **7**, *749* (1970).
37. R. C. Williams, C. K. Osterland, S. Margherita, S. Tokuda, R. P. Messner, J. Immunol., **111**, *1690* (1973).
38. R. R. Porter, Biochem. J., **73**, *119* (1959).
39. J. D. Smiley, H. Horton, Immunochemistry, **2**, *61* (1965).
40. A. L. Tarentino, T. H. Plummer, F. Maley, J. Biol. Chem., **249**, *818* (1974).
41. G. Ionescu, Z. Moldoveanu, I. Moisa, C. Motaş, Rev. roum. biochim., **1**, *19* (1977).
42. H. M. Howell, H. E. Conrad, E. W. Voss, Immunochemistry, **1**, *19*, *111* (1975).
43. J. Zikan, I. Miler, Immunochemistry, **12**, *813* (1975).
44. T. Aoki, A. Shimizu, Y. Yamamura, Immunochemistry, **13**, *461* (1976).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 1, 109 — 120 (1977)

RECENZII

Technical reports series no. 45, *Radioizotope Techniques in the study of protein metabolism* (Metode cu radioizotopi utilizate în studiul metabolismului proteic), International Atomic Energy Agency Vienna, 1965, 259 p.

Acest volum cuprinde lucrările congresului organizat la Viena de către Agenţia Internaţională pentru Energia Atomică în perioada 1 — 5 iunie 1964, congres care a avut ca temă studiul metodelor de preparare a proteinelor şi a altor substanţe de interes biologic, marcate cu izotopi radioactivi.

Congresul a dezbătut, de asemenea, probleme legate de tehnicile cu radioizotopi utilizate în studiul metabolismului proteic, al absorbţiei şi eliminării gastrointestinale a proteinelor, de aplicaţiile clinice ale tehnicilor cu radioizotopi în studiul metabolismului proteic.

Pe lîngă lucrările prezentate sînt date şi rezumatele discuţiilor.

În concluzie, publicaţia este utilă, în ciuda întîrzierii apariţiei sale în bibliotecile noastre, tuturor celor interesaţi în studiul metabolismului proteic.

Zina Moldoveanu

Proceedings series. Radioisotope Sample Measurement Tehniques in Medicine and Biology (Metode de măsurare a radioizotopilor folosite în medicină şi biologie) Simpozon organizat la Viena, 24 — 28 mai, 1965, International Energy Agency, 724 pag., 173 fig., 98 tabele.

Lucrările celor 9 sesiuni ale Simpozionului sînt grupate în acest volum în 8 capitole şi anume : Spectrometria razelor gamma ; Aplicaţiile computerelor ; Analize de activare şi tehnici înrudite ; Tehnici de măsurare în scintilaţia în lichide ; Tehnici de autoradiografie ; Calibrarea echipamentului şi standardizarea radioizotopilor ; Aplicaţiile detectorilor de fază solidă.

În cele 53 de lucrări prezentate sînt cuprinse diverse aspecte ale tehnicilor şi metodelor de măsurare a eşantioanelor de radioizotopi in vitro. Astfel sînt discutate numeroasele aplicaţii ale spectrometriei de raze gamma, metode de radiocromatografie în strat subţire şi pe hîrtie ale izotopilor de energie joasă (raze beta), diverse aspecte ale metodelor de măsurare ale izotopilor care emit raze alfa şi beta aflaţi în fază lichidă.

Acest volum, deşi a fost editat în urmă cu 11 ani, poate fi folosit cu succes de medicii şi biologii care lucrează cu radioizotopi fiind un adevărat ghid de tehnici de lucru.

Ecaterina Ilica

Genetical aspects of radiosensitivity : Mechanisms of repair (Aspecte genetice ale radiosensibilizării : Mecanisme de reparare). Editat de Agenţia Internaţională de Energie atomică (I.A.E.A.), Viena, 1966, 175 pag. 74 fig.

Volumul de faţă cuprinde lucrările unui grup de 21 de specialişti în citologie, genetică, biologie moleculară, biofizică şi biochimie care s-au întrunit de la 18 la 22 aprilie 1966, în Viena, la sediul Agenţiei Internaţionale de Energie Atomică.

Comunicările prezintă observaţii asupra mecanismelor fundamentale responsabile pentru repararea leziunilor induse de către radiaţii la nivel cromosomial, genetic şi molecular, şi anali-

zează posibilitatea valorificării unui model de lucru a reparării. Se prezintă de asemenea aspecte ale controlului genetic și enzimatic al radiosensibilizării, factorii care influențează mecanismele de reparare, precum și aplicațiile radiațiilor în radioterapie.

Detaliile experimentale, ilustrarea grafică, includerea unui rezumat ce precede fiecare lucrare, precum și bogata bibliografie aferentă fiecărui articol, conferă o largă accesibilitate acestui volum.

Maria Andraș

Effects of radiation on meiotic systems (Efectele radiațiilor asupra sistemelor meiotice). Editat de Agenția Internațională de Energie Atomică (I.A.E.A.), Viena, 1968, 223 pag., 70 fig.

Acest volum prezintă lucrările unui grup de lucru întrunit la Viena, de la 8 la 11 mai 1967, în cadrul Agenției Internaționale de Energie Atomică, care dau date despre diferite aspecte ale efectelor induse de radiații asupra sistemelor meiotice.

Partea I prezintă subiecte din domenii de cercetare ca : gametogeneza mamiferelor și comparația răspunsului gonadelor diferitelor specii la radiații, folosirea aberațiilor cromosomilor sexuali în măsurarea efectelor radiațiilor, imporanța studiilor meiotice în identificarea cromosomilor umani și efectele radiațiilor asupra recombinării genetice.

Partea a II-a, destinată metodologiei, include tehnici pentru studierea meiozelor la o varietate de organisme, metode de studiu a radiațiilor în timpul oogenezei precum și procedee histologice pentru analiza meiozelor.

Prin tematica abordată și recomandările Agenției asupra direcțiilor viitoarelor cercetări, publicația de față devine foarte folositoare studiilor citologice.

Andraș Maria

Proceedings series. Effects of Radiation on Cellular Proliferation and Differentiation (Efectele radiației asupra proliferării și diferențierii celulare) International Atomic Energy Agency Vienna 1968 528 pg., 219 fig., 58 tb.

Acest volum cuprinde un număr de 40 lucrări prezentate în cele 9 sesiuni ale Simpozionului, organizat la Monaco în aprilie 1968.

Lucrările sînt grupate în 5 capitole și anume :
Considerațiile teoretice ale lezării și regenerării ; Celulele stem hemopoetice ; Hemopoeza : creșterea și diferențierea ; Limfopoeza și răspunsul imun ; Răspunsul de proliferare ale altor sisteme : celulele tumorale și celulele intestinale.

Problemele abordate în lucrări sînt următoarele : studiul lezării DNA-ului și mecanismele de regenerare ale acestuia sub influența radiațiilor ionizante, starea funcțională a celulelor stem hemopoetice după iradiere, cinetici de multiplicare și diferențiere a celulelor hemopoetice, Feed-back-ul reglării hemopoezei, proliferare și diferențierea celulelor hemopoetice normale și leucemice, cinetica proliferării celulare în tumorile animale și umane.

Acest volum, deși cuprinde lucrări mai vechi, este util tuturor celor care se ocupă cu studiul celulei animale.

Ecaterina Ilica

Radioisotopes for Industrial Microorganisms (Radioizotopii pentru microorganismele industriale) Agenția Internațională pentru Energie Atomică, Viena, 1971, 337 p.

Dedicată unei probleme aplicative cartea de față răspunde unui foarte actual grup de chestiuni : aplicațiile fenomenului radioactiv în microbiologia industrială. Acest domeniu a atins o foarte amplă dezvoltare în ultimii ani datorită marelui său grad de rentabilitate economică. De aceea nu trebuie să ne surprindă importanța care se acordă acestei chestiuni.

De fapt cartea conține lucrările unui simpozion asupra folosirii radiațiilor și radioizotopilor pentru scopurile genetice ale microbiologiei industriale, ținut sub egida Agenției Internaționale pentru Energia Atomică la Viena în 29 martie-aprilie 1971. Din acest motiv cartea este aranjată pe secțiuni conform discuției problemelor ridicate. Pentru realizarea scopului său practic, volumul este asigurat cu un număr de mijloace foarte evident teoretice cum ar fi : mecanismele mutagenezei și procesele de cuplare ; genetica și fiziologia microorganismelor industriale ; rolul mutagenilor fizici și chimici în cercetarea de microbiologie industrială ; căile biosintetice și mecanismele lor de reglare ; mutația și selectarea microorganismelor de utilitate industrială și o privire de actualitate și de viitor asupra cercetărilor aplicative de microbiologie în țările dezvoltate. Economic, științific și în egală măsură educativ, lucrarea este de un mare interes pentru ingineri, biochimiști, biologi, fiziologi și chiar studenți.

Zamfir-Grigorescu Mihai

Radioactive Tracer in Immunology (Trasori radioactivi în imunologie) Agenția Internațională pentru Energia Atomică, Viena, 1972, 129 p.

Această carte conține lucrările unei întruniri (Viena 18 — 22 octombrie, 1971), asupra aplicării tehnicilor cu izotopi radioactivi în imunologia microbiană, organizate de Agenția Internațională pentru Energia Atomică, și de aceea structura sa reproduce cadrul organizatoric al discuțiilor. Cele cinci părți sînt : Tehnici de marcare ; Aplicații în studii epidemiologice ; Studii cu antigen și anticorpi marcați ; Studii cu microorganisme marcate ; Discuții generale asupra aspectelor practice a aplicațiilor tehnicilor cu izotopi radioactivi în imunologia microbiană.

Sînt prezentate metode mai vechi cum ar fi iodurarea, dar de asemenea și altele mai recente cum ar fi folosirea precursorilor specifici marcați, în acest fel abordîndu-se chestiunea la nivel de biologie moleculară cu o mare precizie. Cartea conține de asemenea și criterii teoretice pentru alegerea diferitelor posibilități de marcare într-o perfectă concordanță cu scopul sistemului propus. Sînt prezentate metodele de control, eficiența și alte aspecte, toate acestea fiind întotdeauna însoțite de grija pentru sistemele vii care sînt materialul de lucru. Aproape toate tehnicile imunologice sînt combinate cu folosirea izotopilor radioactivi și rezultatele sînt mai bune pentru sensibilități, specificitățile rămînînd neafectate. Evident, multe reacții devin în acest fel de mare utilitate pentru biochimie prin gradul ridicat de cuantificare a fenomenelor biologice. Cei mai mari beneficiari ai lucrării rămîn, desigur, epidemiologia și bacteriologia, dar sînt interesate multe alte discipline (biochimia, clinica etc.)

Zamfir-Grigorescu Mihai

Proceedings series *Radioimmunoassay and related procedures in Medicine* (Determinarea radioimunologică și tehnici înrudite folosite în medicină), International Atomic Energy Agency, Vienna, 1974, vol. I, 471 p., vol. II, 435 p.

În ultimii ani, determinările radioimunologice precum și tehnicile înrudite au fost obiectul unei deosebite dezvoltări și permanente îmbunătățiri. Aceasta a făcut ca Agenția internațională pentru energia atomică să organizeze pe această temă mai multe simpozioane și anume : în 1964, 1969 și în 1973.

Lucrările acestui ultim simpozion care a a vut loc la Istambul în perioada 10 — 14 septembrie, se ocupă de cele mai importante progrese în domeniul determinărilor radioimunologice. Textele complete ale lucrărilor prezentate sînt însoțite de discuțiile purtate în cadrul simpozionului.

Principalele domenii dezbătute au fost grupate pe baza următoarei problematici generale : Standardizarea și controlul reactivilor și metodelor ; Analiza automată, analiza datelor, determinarea radioimunometrică ; Hormoni glicoproteici ; Hormoni peptidici ; Hormoni steroizi ; Hormoni tiroidieni, AMP ciclic, vitamine și medicamente ; Antigene asociate tumorilor, imunoglobuline ; și Antigene asociate bacteriilor și virușilor.

Pe lîngă lucrările originale, cartea conține și unele lucrări de sinteză privind aspecte generale ale principalelor direcții de dezvoltare în acest domeniu.

Publicația este de un deosebit interes pentru medicina clinică și științele medicale fundamentale.

Zina Moldoveanu

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO MAN. Some aziridines, N—, S—& O-mustards and selenium (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de carcinogeneză prin substanțe chimice, la om. Unele aziridine; N—, S— și O—iperite; seleniu) Volume 9. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1975.

Volumul de față reprezintă punctele de vedere ale experților întruniți la Lyon, 8 — 14 aprilie 1975.

După expunerea de motive și de metodă privind editarea seriei, autorii inserează un subcapitol de generalități asupra substanțelor considerate, urmînd discutarea fiecărei substanțe cu potențial carcinogenic, după schema: date fizice și chimice, incluzînd sinonime, formulă chimică, proprietăți ale substanței în stare pură, producere, utilizare și analiză; date biologice de orice natură, în legătură cu evaluarea riscului de carcinogeneză la animale de laborator și la om; comentarii.

Toate aceste date sînt susținute, pentru cei interesați, de numeroase trimiteri, din toate domeniile conexe.

Dintre substanțele descrise menționăm:

— aziridine: aftolatul, aziridina, aziridil-benzochinona, 2-metil-aziridina etc., avînd întrebuințări diverse: ca medicamente, ca insecticide, în industria textilă;
— iperite („mustards"): clorambucilul, ciclofosfamida, azot și sulf-iperita, Oestradiol- și uracil -mustard etc.
— seleniul și unii compuși ai săi — de exemplu oxiclorura de seleniu.

În final, volumul cuprinde un index al substanțelor discutate, din toată seria.

Vladimir Gheordunescu

B. MUELLER, *Gerichtliche Medizin* (Medicina legală), ediția a II-a revizuită și lărgită, în colaborare cu S. BERG, M. GELDMACHER, -von MALLINCKRODT, O. GRÜNER, G. HARTMANN, R. HELMER, W. JANSSEN, W. KIESSLING, H. KLEIN, G. MÖLLHOFF, W. NAEVE, W. REMMELE, CH. RITTNER, G. SCHAIDT, F. SCHLEYER, E. SCHWINGER, K. SELLIER, CH. STEFFENS, H.-D. WEHNER, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975, 2 vol., 369 fig., 1331 pag.

Cele două volume, de o înaltă ținută științifică și editate în condiții grafice excelente, prezintă, într-o formă concisă și foarte bine sistematizată, multiplele aspecte, uneori deosebit de dificile, cu care se văd confruntați medicul legist și ceilalți specialiști dintr-un domeniu atît de complex cum este cel al medicinei legale. Ținîndu-se cont de performanțele remarcabile ale metodelor moderne de investigare, sînt prezentate pe rînd — după un articol introductiv consacrat obligațiilor medicului ca expert și referent și amănuntelor legate de desfășurarea procedurii penale — aspecte referitoare la moarte și constatarea ei, examinarea cadavrului, cercetarea urmelor, posibilitățile și metodele de identificare, cauzele multiple ale morții, medicina traficului rutier și a accidentelor de circulație (vol. I), toxicologia, patologia sexuală, ginecologia forensică, stabilirea paternității (vol. II).

Volumele de față oferă celui interesat în clarificarea unui caz posibilitatea de a se documenta asupra probelor care în prezent pot fi considerate ca suficient de sigure sau ca nesigure și asupra celor la care ar mai putea apela, indică cercetătorului puncte de plecare în cercetările sale științifice, pentru domenii care mai prezintă încă lacune și care mai necesită o aprofundare și o completare, și servesc ca material de documentare și orientare asupra stadiului actual al cunoștințelor atît pentru judecător, avocat și procuror, cît și pentru criminaliști.

Fiecare capitol se încheie cu o bogată literatură de specialitate, adusă pînă la mijlocul anului 1974. Un index alfabetic pe subiecte completează în mod util această lucrare atît de vastă și de prețioasă.

Horst D. Schell

Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds (Transformările microbiene ale compușilor ciclici nesteroidici), de Klaus Kieslich, ed. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1976, 1262 pag., 225 tb., 449 scheme.

Lucrarea cuprinde pentru prima dată laolaltă toate informațiile cu privire la folosirea microorganismelor, care metabolizează compuși de tip nesteroidic, ca intermediari în sintezele organice.

Autorul face o clasificare a substanțelor folosite de microorganisme, discută tehnici de sinteză și dă aplicațiile acestora.

Lucrarea se adresează atît celor care nu sînt familiarizați cu acest domeniu de folosire a microorganismelor în etape de sinteză a unor substanțe organice cît și acelora care le folosesc ca stadiu intermediar de sinteză organică.

Avînd o bogată bibliografie lucrarea este deosebit de interesantă pentru biochimiști, microbiologi și chimiști organicieni.

Ecaterina Ilica

IONIC ACTIONS ON VASCULAR SMOOTH MUSCLE with Special Regard to Brain Vessels (Acțiunea ionilor asupra mușchiului neted vascular, în special asupra circulației cerebrale) Editor E. Betz, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1976. 158 pag. 48 fig.

Volumul cuprinde lucrările Simpozionului cu tema „Mușchii netezi vasculari", care a avut loc la Tübingen, în februarie 1976. Aceste lucrări s-au ocupat, în special, cu rolul ionilor în transmiterea semnalelor de la spa-iul perivascular către elementele contractile din pereții mușchilor netezi, precum și cu rolul unor metaboliți (ex. adenozina și cAMP) în aceste procese.

O atenție deosebită este acordată aspectelor funcționale și, în special, acelora care privesc variațiile ionilor în țesutul cerebral și relația cu controlul metabolic și nervos al circulației cerebrale.

Volumul prezintă o serie de aspecte metodologice, cuprinzînd noile tehnici de investigare a relației ioni — membrane și structurile interne ale celulelor mușchilor netezi implicați.

Se dau numeroase exemple asupra influenței diferitelor medicamente și rolului lor în reglarea fluxului sangvin, prin inhibiția sau facilitarea acțiunii ionilor asupra celulelor mușchilor netezi. Din acest punct de vedere, volumul aduce o contribuție importantă la tratamentul medicamentos cu aceste substanțe.

Atît prin aspectele teoretice, cît și prin cele terapeutice, volumul de față contribuie la elucidarea unora dintre multiplele aspecte legate de reglarea fluxului sanguin.

Magdalena Dedu

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO MAN. Some naturally occuring substances (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic a substanțelor chimice la om. Unele substanțe naturale) Volume 10. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1976.

Acest volum prezintă punctul de vedere al Grupului de lucru IARC, întrunit la Lyon, între 7 — 13 octombrie 1975, în vederea evaluării riscului carcinogenei chimice, reprezentat de substanțe răspîndite în natură, cu diferite funcții metabolice sau medicamentoase, printre

care : actinomicine ; aflatoxine ; azaserină ; cloramfenicol ; colesterol ; griseofulvină ; mitomicină C ; acid parascorbic ; acid penicilic ; rezerpină ; taninuri etc.

Un capitol mai omogen din punct de vedere chimic îl reprezintă alcaloizii pirolizidinici, reprezentați în monografia de față de 9 substanțe, printre care izatidina, jacobina, monocrotalina, etc.

La fiecare substanță sau grup de substanțe sînt trecute în revistă : proprietățile chimice și fizice, datele accesibile din literatura de specialitate, biosinteza, utilizarea, analiza. O importanță deosebită se acordă datelor biologice, administrării, observațiilor diferențiate pe diferite specii de animale și pe om.

Vladimir Gheordunescu

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK OF CHEMICALS TO MAN. Cadmium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general consideration on volatile anaesthetics (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic a substanțelor chimice la om. Cadmiu, nichel, unii epoxizi, diferite substanțe industriale și considerații generale asupra anestezicelor volatile) Volume 11. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1976.

Acest volum prezintă punctul de vedere al Grupului de lucru IARC, întrunit la Lyon, între 9 — 11 decembrie 1975 ; sînt discutați compuși ai cadmiului și nichelului, diferiți epoxizi (diepoxibutan, etilen-oxid, glicidaldehidă etc.) ; diverși compuși chimici de interes industrial (clorură de benzil, β — și γ — butirolactonă etc.) din punct de vedere al proprietăților fizice și chimice, al datelor biologice privind riscul de carcinogeneză la animale și om, cu numeroase trimiteri la revistele și studiile de specialitate.

În final, se acordă atenție anestezicelor volatile, dintre care unele frecvent folosite : eterul, protoxidul de azot, halotanul.

Volumul de față este nu numai un îndreptar util și un instrument de lucru pentru cei interesați ; el se înscrie, în egală măsură, în problematica atît de actuală a poluării.

Vladimir Gheordunescu

Bausteine der modernen Physiologie, W. Halle, *Zell-und Gewebezüchtung bei Tieren* (Bazele fiziologiei moderne ; Cultivarea celulelor și țesuturilor animale), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976, 15 fig., 12 tabele, 4 planșe, 171 pag.

Volumul cuprinde — într-un mod didactic și deosebit de sistematic — cele mai importante caracteristici și rezultate ale cercetărilor privind culturile de celule și țesuturi animale.

În prima parte a volumului sînt expuse bazele metodologice ale culturilor de celule și țesuturi, material frecvent utilizat în ultimii ani în laboratoarele de cercetare, medicale etc. După indicarea condițiilor pe care trebuie să le îndeplinească un laborator și instrumentarul afectat acestor studii (spălare, sterilizare), sînt expuse metodele de izolare a materialului biologic, conservarea acestuia la temperaturi scăzute, culturile și mediile nutritive (naturale, semisintetice, sintetice, selective etc.). O atenție deosebită se acordă suprafețelor suportului și raporturilor dintre celulă — mediu nutritiv și suport.

Un alt capitol al cărții se referă la tipurile de culturi : de țesuturi, celule și organe. Mai pe larg, sînt prezentate culturile de celule (primare, linii celulare, colonii, culturi în suspensie) și modurile de cultivare a acestora (procedee continui, culturi pe suprafețe multiple, culturi dinamice).

Ultima parte a volumului se referă la biologia „in vitro" a celulei, abordînd numeroase aspecte dintre care menționăm : proprietățile suprafețelor și membranelor, probleme de dinamică celulară, importanța AMP ciclic, creșterea și transformarea celulelor, cooperarea metabolică, hibridizarea, proprietățile specifice de țesut și organ. Ultimele pagini ale cărții se referă la utilizarea practică a culturilor celulare în virusologie, în cercetările asupra cancerului, în

testarea preterapeutică a sensibilității față de hormoni, în studii de mutageneză, în cercetarea sintezei imunoglobulinelor etc.

Bibliografia bogată și indexurile de autori și subiecte ușurează accesul cititorului la problemele urmărite, probleme actuale și deosebit de utile atît specialiștilor cît și studenților.

Popov Lucia-Doina

G. HABERMEHL, *Gift-Tiere und ihre Waffen* (Animale veninoase și armele lor), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 27 fig., 6 planșe în culori, 126 pag.

Subtitlul cărții *Introducere pentru biologi, chimiști și medici și călăuză pentru turiști* ilustrează adecvat bogatul conținut al acesteia. Cele 8 părți ale volumului tratează acțiunea otrăvitoare, tratamentul, structura chimică și acțiunea farmacologică a diferitelor substanțe toxice produse de reprezentanți ai celenteratelor, moluștelor, artropodelor, echinodermelor, peștilor, amfibiilor și reptilelor. Sînt descrise atît simptomele otrăvirilor cît și metodele de tratament.

Este notabilă și instructivă încadrarea diferitelor animale veninoase în mediul ecologic, precum și descrierea modului lor de viață, a chimiei și modului de obținere a otrăvii produse de respectivele animale. Fiecare din capitolele cărții este susținut de indicații bibliografice. Remarcabilă este atenția acordată tratamentului împotriva otrăvirilor respective, cum arată și faptul că în ultima parte a cărții există chiar o listă de institute în care se obțin anti-veninuri.

Importanța volumului reiese clar din două caracteristici ale sale : atrage atenția cercetătorului asupra acestui grup de animale ale căror substanțe toxice prezintă interes din punct de vedere chimic și medical, iar celui ce călătorește în regiuni tropicale și subtropicale îi oferă date asupra răspîndirii geografice și biologiei animalelor veninoase, prezentînd totodată mijloacele concrete de combatere a efectelor nocive ale acestora. Nespecialistului îi sînt adresate și explicațiile cuprinse în lista de termeni medicali de la sfîrșitul cărții.

Popov Lucia-Doina

H. G. HENNING, W. JUGELT, G. SAUER, *Praktische Chemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* (*Chimie practică pentru medici și biologi*), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1976, 434 pag., 76 fig., 32 tabele, ediția a 3-a completată.

Cartea de față este un exemplu de abordare modernă, sistematică și la nivel științific elevat a celor mai importante noțiuni și probleme de chimie necesare studenților în medicină sau biologie. Fiecare noțiune nou învățată este aplicată în probleme a căror rezolvare asigură o însușire dinamică a materiei. Schemele, graficele și ilustrațiile auxiliare formează un aspect grafic intuitiv și ușor de reținut al cuprinsului.

Volumul cuprinde 5 părți : Prima, *Introducere în practica laboratorului de chimie* tratează unele probleme generale legate de stilul de muncă (experimentul, reguli generale de lucru, prim ajutor etc.) și de tehnica de lucru (prelucrarea sticlei, aparate de laborator și folosirea lor, aparate de măsură, separarea substanțelor prin precipitare sau cristalizare, uscarea chimicalelor, distilarea). Cea de-a doua parte *Bazele chimiei generale și anorganice* cuprinde noțiuni de bază aplicate apoi în probleme de stoichiometrie, structura atomului, sistemul periodic al elementelor, legătura chimică, reacțiile elementelor și combinațiilor lor. Foarte utilă unei informări largi de chimie este partea a treia a cărții referitoare la *Aspecte cantitative ale reacțiilor chimice*. Sînt prezentate aici probleme privind energetica și cinetica reacțiilor chimice, aspecte ale disocierii electrolitice, solubilității, combinațiilor și reacțiilor complexe, oxidării și reducerii. Cea de-a patra parte a cărții, *Bazele chimiei organice*, se referă la structura și reactivitatea compușilor organici, la combinațiile C—O, C—S, C—N și la combinațiile macromoleculare sintetice. Ultima parte, *Metode analitice*, cuprinde noțiuni teoretice și îndrumări practice asupra metodelor utilizate în general în laboratorul de chimie, și asupra analizei anorganice și organice.

Popov Lucia-Doina

R. DARGEL, W. GRAF, *Lehrprogramme der funktionnellen Biochemie, Teil 3, Stoffwechsel der Kohlenhydrate* (Program de studiu al biochimiei funcționale, partea a treia, *Metabolismul hidraților de carbon*), de H. P. KLEBER, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976, 124 pag.

Volumul cuprinde — într-un mod didactic și deosebit de sistematic — cele mai reprezentative aspecte ale metabolismului hidraților de carbon. Cititorul — student sau cercetător — poate învăța cu ușurință, de unul singur, reacțiile glicolizei, calea gluconeogenetică, mecanismele de reglare ale glicolizei și gluconeogenezei, sinteza și degradarea glicogenului, ciclul pentozofosfaților sau transformările glucidelor. Modul modern de însușire a cunoștințelor reiese din necesitatea rezolvării unor probleme înainte de a trece la rezolvarea altora, din gradarea dificultății testelor prezentate, ca și din includerea unor teste de control, pe parcurs. Volumul cuprinde, de asemeni, un scurt rezumat al noțiunilor celor mai importante, diagrame, index de subiecte și schematizarea unor procese cum ar fi : gluconeogeneza, activarea adenil ciclazei și fosforilazei, ciclul oxidativ al pentozofosfaților și glicoliza.

Prin modul în care este concepută această carte, rezolvarea testelor propuse asigură cititorului însușirea temeinică a cunoștințelor, fiind un exemplu de învățare modernă a biochimiei. Dealtfel, întreaga serie de volume cuprinsă în *Programul de studiu al biochimiei funcționale* oferă cititorului un mod activ și, în același timp, eficient de însușire a cunoștințelor.

Popov Lucia-Doina

Ergebnisse der experimentellen Medizin, Band 23, Stofftransporte im Organismus (Rezultate de medicină experimentală, vol. 23, *Transportul substanțelor în organism*), editor : P. G. Linke, H. Opitz, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1976, 416 pag.

Volumul cuprinde 47 referate generale și lucrări originale susținute în cadrul Sesiunii anuale a fiziologilor și Societăților de Fiziologie Patologică din R. D. Germană, Halle, 1974. Aceste lucrări sînt grupate în șase capitole :

Din lucrările primului capitol *Energetica transportului ionilor*, citățm : *Transformările de energie la nivelul membranelor biologice*; *Bazele enzimatice ale transportului ionilor și rolul posibil al acestui proces în transportul activ al substanțelor*; *Cercetări experimentale asupra mecanismelor de schimb ionic la nivelul structurilor membranelor biologice*. Din cel de-al doilea capitol *Microcirculația și schimbul de gaze*, spicuim : *Mecanismele schimbului de gaze în organism*; *Schimbul de gaze la nivel pulmonar după autotransplantarea plămînului la cîine*. Al treilea capitol al cărții cuprinde lucrări referitoare la *Transportul substanțelor în miocard*. Dintre acestea menționăm : *Rolul AMP ciclic și proteinkinazelor dependente de AMP ciclic în reglarea funcției inimii*; *Influențe reciproce între prostaglandinele E_2 și F_{2a} și isoprenalină în inima de cîine, în situ*. Capitolul IV, *Procese de penetrare și permeabilitate* include lucrări asupra *Fagocitozei și pinocitozei*; *Bazele energetice ale proceselor de transport la nivelul rinichiului în cursul dezvoltării postnatale*; *Influența ionilor străini asupra microfonopotențialelor cohleare*. Capitolul V, prezintă lucrări asupra proceselor *Neuroendocrine și de transport*, cum ar fi : *Producerea, izolarea și caracterizarea factorilor de somn delta*; *Procese de formare și transport ale transmițătorului neurohormonal*. Ultima parte a cărții include lucrări privind bariera *Singe-organ*, ca de exemplu : *Acțiunea diferită a vasopresinei și oxitocinei asupra proceselor nervoase și cauzele ei probabile*; *Activitatea neuronală a hipotalamusului și reacțiile homeostatice*; *Asupra problemei proteinelor legate de acizii grași în placenta de șobolan*; *Date cantitative asupra transportului acizilor grași de la mamă la făt la șobolan*.

Condiția grafică excelentă — cuprinzînd numeroase diagrame, scheme și planșe — înalta ținută științifică și informarea bibliografică deosebit de valoroasă, fac din acest volum o carte utilă atît specialiștilor medici, biologi, chimiști cît și studenților care vor să aprofundeze domeniul atît de captivant al proceselor de transport al substanțelor în organism.

Popov Lucia-Doina

R. GLASER, *Einführung in die Biophysik* (Introducere în biofizică), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976, ed. II-a, 107 fig., 13 tabele, 349 pag.

Volumul de față formează cititorului — specialist sau student — o imagine cuprinzătoare asupra dezvoltării deosebite a biofizicii în ultimii ani, asupra capacității acestei disci-

pline de a descrie prin mijloace matematice fenomenele biologice ca și asupra apariției unei biologii teoretice moderne.

În prima parte a volumului sînt descrise obiectul, conținutul și limitele biofizicii. Partea a II-a tratează structura moleculară a sistemelor biologice insistînd asupra următoarelor probleme : legăturile dintre molecule, cuantele de energie nontermică din sistemele biologice, mișcarea termică a moleculelor, interacțiile moleculare și ionice ca bază a formării structurilor biologice, fenomene de limite de fază. Cea de a III-a parte a cărții evidențiază probleme legate de termodinamica sistemelor biologice și a reacțiilor biochimice. În subcapitole aparte sînt dezvoltate unele considerații asupra termodinamicii stării de echilibru, unele fenomene electrofiziologice, bazele termodinamice ale proceselor ireversibile etc. Partea a IV-a a cărții cuprinde cinetica sistemelor biologice. Sînt prezentate astfel sisteme de reacții și sisteme de schimb, multiplicarea și creșterea în lumina teoriei sistemelor și unele principii ale transmiterii de informații și prelucrării datelor. Ultima parte a volumului se ocupă de interrelațiile sistemului biologic cu lumea nevie, prezentînd date asupra influenței temperaturii, curenților, vibrațiilor mecanice, electromagnetice și radiațiilor corpusculare.

Nivelul științific deosebit de elevat, tratarea matematică a cuprinsului, graficele și diagramele prezentate, contribuie la reușita acestei cărți.

Popov Lucia-Doina

Structure and bonding, vol 28, *Electrons in oxygen-and sulphur-containing ligands.* (Structură și valențe, vol 28, Electronii în liganzi cu oxigen și sulf); Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 131 p., 25 fig., 15 tabele.

Volumul de față cuprinde trei articole privind oxigenările reversibile, derivații anorganici ai acizilor oxohalogenofosforici și ditiocarbamații elementelor tranziționale.

În primul articol, *Oxigenarea reversibilă*, R. W. Erskine și B. O. Field (Universitatea municipală, Londra) tratează două aspecte principale ale problemei, și anume orientarea dioxigenului în complexele dioxigenate și factorii care afectează reversibilitatea procesului de oxigenare. Datele prezentate se referă atît la porfirine naturale, cît mai ales sintetice, iar valoarea articolului este evidentă pentru înțelegerea transportului oxigenului de către mio- și hemoglobină.

În al doilea articol — *Aspecte privind structura și valențele în chimia fosforului — derivați anorganici ai acizilor oxohalogenofosforici* — K. Dehnicke și A. F. Shihada (Universitatea Marburg) tratează comparativ acizii halofosforici din punct de vedere al proprietăților coordinative, al anisotropiei derivate din scăderea sarcinii electrostatice, al structurii și valenței speciilor izoelectronice.

Un ultim articol al volumului — *Ditiocarbamații elementelor din grupele tranziționale, în stări de valență „neobișnuite"*, — J. Willemse, J. A. Cras, J. J. Steggerda (Universitatea Nijmesgen) trec în revistă complecșii metalelor tranziționale în stări de oxidare „neobișnuite" cu ditiocarbamații, prezentînd și cîteva metode de investigare a structurii și valențelor acestor complexi. (EPR, spectroscopie Mössbauer, spectroscopie fotoelectronică, studii voltametrice).

Fiecare articol se încheie cu o bogată listă bibliografică.

Din cele prezentate, rezultă interesul pe care acest volum îl poate prezenta pentru cei preocupați de studiul valențelor și structurilor chimice.

Constanța Mușolan

Fortschrite der experimentellen und theoretischen Biophysik, Band 20, Proteinbiosynthese bei Mikroorganismen unter Einwirkung von äußeren electromagnetischen Feldern (Progrese în biofizica experimentală și teoretică, vol. 20, Biosinteza proteinelor de către microorganisme sub acțiunea cîmpurilor electromagnetice externe), de ANDRAS VARGA, VEB Georg Thieme, Leipzig, 1976, 107 p., 34 fig.

Volumul 20 ale seriei *Progrese în biofizica experimentală și teoretică* tratează problema biosintezei proteinelor de către microorganisme dintr-un punct de vedere mai puțin obișnuit, și anume cel al efectului cîmpurilor electromagnetice externe. Volumul pleacă de la ideea că procesele bioenergetice sînt constituite dintr-o serie de fenomene termo- și electrodinamice, a căror desfășurare depinde de modificările energetice din mediul înconjurător.

Autorul a ales ca material de investigație microorganismele și și-a propus să lămurească cîteva aspecte ale relației energie electromagnetică — biosinteza proteinelor.

Astfel, se pune problema ordinului de mărime al energiei exterioare, în măsură să afecteze procesele biologice; care este parametrul electromagnetic cel mai important din punct de vedere biologic; care dintre forțe — electrodinamică sau magnetodinamică — au valoare biologică; care este valoarea optimă a parametrului aplicat.

Trebuie apoi stabilit la ce nivel biologic lucrează parametrul electromagnetic ales, și în ce măsură efectele constatate sînt specifice acelui parametru. În legătură cu acesta, trebuie lămurit dacă efectul primar este localizat intra- sau extracelular, și ce rol are membrana celulară în aceste procese.

Aceste probleme sînt abordate de autor în două capitole teoretice și în cinci capitole experimentale. Rezultatele originale ale autorului completează — sau contrazic — unele ipoteze anterioare privind efectul cîmpurilor electromagnetice asupra proceselor biochimice, evidențiind în special acțiunea mediată a acestora, asupra permeabilității membranelor, aparatului genetic, reacțiilor biochimice în general.

Acest volum reprezintă o contribuție originală și valoroasă la o problemă interesantă atît teoretic cît și practic (de ex. poluarea „electronică" sau — pe de altă parte-producția microbiană de proteine).

Constanța Mușolan

SIEGFRIED FITTKAU, *KOMPENDIUM DER ORGANISCHEN CHEMIE* (Compendiu de chimie organică), VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1976, 248 p., 23 fig., 31 tabele.

Acest compendiu se află acum la a treia ediție, fapt elocvent pentru calitățile lui. În primul rînd trebuie subliniată conciziunea acestui manual, astfel încît el poate cuprinde în circa 200 pagini (în octavo) noțiunile de bază referitoare la aproape toate capitolele de chimie organică.

Destinat în primul rînd studenților în medicină și biologie, pentru a fi folosit în cadrul lucrărilor practice, compendiul oferă într-un stil precis și accesibil — materialul teoretic necesar acestui scop.

Volumul este bogat ilustrat cu figuri, scheme, tabele, foarte utile în efectuarea unor lucrări și probleme de chimie organică.

Recomandăm compendiul atît studenților, cît și tuturor celor care — într-un mod sau altul — au nevoie de o colecție concisă de date de chimie organică.

Constanța Mușolan

F. A. GRIES, P. BERCHTOLD, M. BERGER, *ADIPOSITAS; PATHOPHYSIOLOGIE, KLINIK UND THERAPIE* (Adipozitatea, patofiziologie, clinică și terapie), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 281 p., 94 fig., 29 tabele.

Acest volum tratează o problemă care, depășind limitele esteticului și socialului, intră — în special în țările dezvoltate — în sfera patologiei.

Adipozitatea are aspecte complexe, cărora autorii acestui volum le acordă atenția corespunzătoare.

Astfel, sînt prezentate aspectele sociologice și cele psihiatric-psihologice. Patofiziologia adipozității este discutată din punctul de vedere al alimentației, al bilanțului energetic, al reglărilor metabolice și endocrine, cu o atenție specială hormonilor implicați în adipozitate (hormonul de creștere, corticoizii, glucagonul, insulina).

Aspectele clinice ale adipozității se referă la organele cele mai diverse (plămîni, inimă, rinichi, etc.).

În capitolul *Terapia adipozității* autorii trec în revistă terapia prin dietă („zero", respectiv „de reducție"), psihoterapia, terapia medicamentoasă (inhibarea apetitului, tratament hormonal, etc.), terapia chirurgicală, fizioterapia etc.

Întregul material al volumului se bazează pe un foarte mare număr de lucrări de specialitate originale, monografii, comunicări la congrese.

Volumul bogat ilustrat, este — prin actualitatea lui, și prin informația la zi pe care o cuprinde, foarte util personalului medical interesat de problema adipozității, și chiar pacienților.

Constanța Mușolan

Avian Physiology, ed. P. D. Sturkie, third edition, (Fiziologia păsărilor), Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1976, 400p.

Este un manual cu caracter monografic, de fiziologie aviană, de tip clasic, primul de acest gen în întreaga lume, reprezentînd o contribuţie colectivă recentă (într-un singur volum) la cunoaşterea celor mai importante aspecte ale anatomiei şi fiziologiei păsărilor.

Datele cuprinse în cele 21 capitole se referă în majoritate la puiul de găină, de raţă şi de porumbel, dar şi la o serie de specii sălbatice. În comparaţie cu cele două ediţii anterioare (1954 şi 1966), volumul de faţă reprezintă o ediţie revizuită cu ultimele informaţii, aduse la zi, în special la capitolele endocrinologie, reproducere, inima şi circulaţia, respiraţia, sistemul nervos, termoreglarea. Conţine capitole noi, metabolismul lipidic şi proteic, pancreasul şi glandele suprarenale, redactate de specialişti de prestigiu.

Manualul de „Fiziologie aviană" este utilizabil în învăţămîntul superior (pentru cursurile de fiziologie comparată, ornitologie, zoologie, anatomie comparată, ecologie) putînd servi, în egală măsură, şi ca sursă de informaţii bibliografice în domeniul fiziologiei experimentale, biochimiei, nutriţiei şi farmacologiei. În acest din urmă domeniu el se adresează în special cercetătorilor preocupaţi de creşterea păsărilor (mai ales de tip industrial), zootehniei şi medicinei veterinare, oferind cunoştiinţe suplimentare de fiziologie normală, endocrinologie şi biochimie, necesare în practica zootehnică şi veterinară.

Date fiind importanţa subiectului cît şi calitatea informaţiilor cuprinse în această carte, o recomandăm călduros atenţiei cititorilor interesaţi, propunînd în acelaş timp traducerea ei în limba română.

Elena Erhan-Dincă

Structure and Bonding, vol. 29, *Biochemistry* (Structură şi valenţe vol. 29, Biochimie); Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1976, 219 p, 51 fig., 48 tabele.

Acest volum conţine 4 capitole.

În primul capitol, intitulat *Baza moleculară a fixării dinitrogenului*, semnat de W. G. Zumft (347 ind. bibl.) sînt prezentate date referitoare la fixarea fotosintetică a N_2 prin intermediul nitrogenazei, enzimă care are în structura sa molibden, şi a cărei activitate este inhibată de glutamină, asparagină, uree şi nitrat, iar ATP are un efect reglator asupra acestei enzime.

În capitolul al doilea, intitulat *Asimilarea elementelor de către sistemele biologice*, semnat de J. J. R. Frausto de Silva, R. J. P. Williams, (40 ind. bibl.), este prezentat modul de absorbţie şi capturare selectivă a cationilor şi anionilor de către sistemele biologice.

Capitolul al treilea *δ-Aminolevulinat dehidratazele: proprietăţi moleculare şi ambiante*, semnat de A. M. Cheh şi J. B. Neilands, prezintă purificarea, proprietăţi moleculare, catalitice şi rolul Zn în δ-aminolevulinat dehidrază (5-aminolevulinat hidrolază, E.C. 4.2.1.24), a doua enzimă care ia parte la biosinteza hemului în ficatul mamiferelor.

În ultimul capitol *Chimia biologică a aurului* semnat de P. J. Sadler, (142 ind. bibl). este prezentat aurul ca medicament metalic şi ca atom greu marcat cu valenţe variabile. Sînt prezentate avantajele potenţiale ale folosirii aurului în clinică sub formă de Au(I) şi a aurotiomalatului ca anti inflamator şi ca probă de descoperire a cauzei îmbolnăvirilor.

Cartea se încheie cu indexul pe autori al volumelor 1 — 29 ale cărţii *Structură şi legare*.

Cartea prezintă interes atît pentru cei ce lucrează în domeniul medicinei cît şi al biochimiei.

Natalia Moldoveanu

M. MEHRING, *High Resolution NMR Spectroscopy in Solids* (*Spectroscopia RMN de înaltă rezoluţie în solide*) *în „NMR — Basic Principles and Progress"*. 11; *Editors: P. Diehl. E. Fluck, R. Kosfeld*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 243 p. 104 fig.

Unul din scopurile principale ale acestei monografii este trecerea în revistă a tehnicilor de lucru recent descoperite care funcţionează în spaţiul spinilor şi sînt capabile să reducă interacţiunile dipolare şi cuadrupolare ce maschează interacţiunile slabe din solide.

Pentru sublinierea anizotropiei interacţiunilor spinului nuclear se folosesc tensorii de gradul doi, prezentarea limitîndu-se la rotaţiile din spaţiul real, în care context este discutată

metoda rotației probei cu unghiul „magic" față de cîmpul magnetic static, în urma căreia dispar interacțiunile dipolare homonucleare și heteronucleare, reținîndu-se numai deplasarea izotropică, cît și reorientarea moleculară.

Există un capitol care se referă la experimentele de impulsuri multiple, fiind tratate în detaliu medierea coerentă, medierea secundară și influența imperfecțiunii pulsurilor.

După revederea principiilor fundamentale ale dublei rezonanțe, sînt analizate experimentele bazate pe această metodă asupra spinilor rari, în scopul obținerii spectrelor de înaltă rezoluție în solide. Din cauza micii lor abundențe, cuplarea dipolară homonucleară a unor nuclei ca ^{15}N, ^{13}C etc. este foarte slabă, necesitînd decuplarea lor de spinii abundenți, în urma căreia se obțin spectre de rezoluție corespunzătoare.

Un capitol întreg prezintă principala aplicare a tehnicilor de manipulare și diluare — determinarea tensorilor de ecranare magnetică.

Cunoscîndu-se că relaxarea spin-rețea nu a jucat un rol dominant în RMN de înaltă rezoluție în solide, în final sînt date cîteva aplicații folositoare ale tehnicilor descrise în capitolele anterioare, relativ la investigarea creșterii entropiei sistemului de spini datorită interacțiunii cu rețeaua.

Lucrarea se încheie cu o bibliografie masivă, fiind citați și cercetătorii români care au adus contribuții în acest domeniu. Aplicarea rezonanței magnetice nucleare în studiul structuri solidelor se credea a fi extrem de limitată pînă în 1974, de cînd, așa cum înfățișează volumuli prezentat, s-a realizat o largă și profundă utilizare a acestei metode datorită descoperirii unor noi tehnici.

Daniel Brăcăcescu

SELEN V BIOLOGHII (Seleniul în biologie), Materialele celei de-a doua conferințe științifice, Baku, 27 — 29 mai 1975, Ed. Elm, Baku, 1976, 2 vol., 320 p.

Culegerea publicată sub titlul de mai sus cuprinde comunicările prezentate la cea de-a doua conferință științifică organizată de Academia de Științe a R.S.S. Azerbaigeană, din 27 — 29 mai 1975.

Această conferință a fost determinată de interesul crescut manifestat de cercetători în studierea rolului seleniului în sistemele biologice, datorat în special proprietăților sale antioxidante. Deasemeni, este îndeobște cunoscut rolul seleniului în procesele de fotorecepție, fapt care îndreptățește folosirea combinațiilor de seleniu în farmacologie. Acțiunea acestui element la nivelul sistemului organelor intracelulare și al complexelor membranale arată posibilitatea folosirii lui în medicația unor stări patologice ale organismului uman sau animal.

În primul volum al acestei culegeri, format din două capitole sînt cuprinse comunicările referitoare la relațiile dintre seleniu și procesul vizual, ca și cele privind acțiunea compușilor de seleniu, studiată pe plan medical, fiziologic și biochimic. Se pot astfel menționa cîteva dintre aceste preocupări ca : influența seleniului asupra sensibilității ochiului de lumină, efectele seleniului asupra lipidelor din retină, proceselor de oxidoreducție în stare normală și patologică, sistemului cardiovascular, sintezei acidului ribonucleic în sistem acelular, etc., interrelația dintre seleniu și vitamina E, acțiunea seleniului asupra activității enzimelor lizozomiale și altele.

În cel de-al doilea volum există trei capitole : 1. — cuprinde comunicările privind proprietățile radioprotectoare și antitumorale ale compușilor de seleniu ; 2. — expune rezultatele privind acțiunea seleniului utilizat în agricultură ; 3. — se referă la cercetările privind prezența seleniului în ape, soluri și organisme. Se pot astfel enumera unele comunicări privind : grupările — SH, conținutul de aminoacizi liberi, imunoelectroforeza proteinelor serice, spectrul lacticodehidrogenazei etc. la animale iradiate și tratate cu diverse combinații chimice de seleniu. Cercetările privind utilizarea seleniului în agricultură sînt variate : de la influența acestui element în procesele germinative, de dezvoltare și creștere a plantelor, pînă la acțiunea mutagenă a seleniului. În ceea ce privește prezența seleniului în mediul înconjurător, se pot cita lucrările de identificare a acestui element în apele Mării Caspice, în solul Caucazului, precum și importanța lui în dezvoltarea microorganismelor etc.

Culegera reprezintă o sursă de informare necesară celor care se interesează de cunoașterea influenței și acțiunii seleniului asupra sistemelor biologice, ceea ce va permite o aplicare practică a acestui element în diverse domenii ale biologiei.

Corina Iordache

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc. Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la 2 rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe o pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : 7000-Bucureşti 2, P.O.B. 1002.

90 IVII 7761

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, **Chimia algelor marine**, 1974, 212 p., 1 pl., 18 lei.

D. A. ABRAHAM, **Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP şi RADU CODREANU (sub redacţia), **Istoria ştiinţelor în România-Biologia**, 1975, 287 p., 13,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 20, NR. 1, P. 1—120, BUCUREŞTI, IANUARIE—IUNIE, 1977

I. P. „Informaţia" — c. 7087

43 816

Lei 20. —

F1330

studii şi cercetări de

biochimie

2

TOMUL 20

1977

IULIE—DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 20, nr. 2, p. 121—240, 1977, Bucureşti

SCBIAS — 20,(2), 121—240 (1977)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136–137 telex : 11226, București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, P.O.Box 1002, București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1. cod 71021

MUSZAKI KÖNYVTÁR ÉS DOKUMENTÁCIÓS KÖZPONT 1953

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 20, nr. 2 1977

IULIE—DECEMBRIE

SUMAR

M. ŞERBAN, Impactul biochimiei cu unele domenii ale ştiinţelor agricole . . . 125

RODICA BÎRNESCU, S. VASU, Acizii nucleici din unele tulpini şi mutante de *Aspergillus niger* 129

B. BÖHM, SILVIA GABOR, ELENA ZUGRAVU, Acizii graşi din ţesutul pulmonar şi surfactantul alveolar în silicoza experimentală 135

VICTORIA COLDEA, Determinarea seleniului din urină prin metoda redizolvării electrolitice 139

ILEANA DINU, LIANA BOGHIANU, Cercetări asupra mecanismului de acţiune al cuprului în intoxicaţia subacută cumulativă 143

OFELIA GOZIA, M. ŞERBAN, DOINA POPOV, Caracterizarea ultrastructurală şi biochimică a gonadelor unor specii de peşti în diferite stadii de dezvoltare. IV. Comportarea la gel-filtrare a proteinelor acvosolubile . 149

MAGDALENA LUNGU, S. VASU, Compoziţia în nucleotide a RNA-ribozomal din *A. niger* 155

ŞTEFANIA MARCOVSCHI, DOMNIŢA CRIŞAN, SILVIA VIERU, Efectul iradierii benzil-penicilinei şi cloramfenicolului asupra creşterii unor tulpini de *E. coli* 159

VIORICA MOGA, Conţinutul în azot proteic şi în apă la două specii de alge din mediu de viaţă diferit. 165

NATALIA MOLDOVEANU, A. RADU, Purificarea şi unele proprietăţi fizico-chimice şi cinetice ale malat dehidrogenazei mitocondriale 169

CONSTANŢA MUŞOLAN, Acţiunea inhibitorilor metabolici asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb 177

G. NEAMŢU, E. KOCSIS, M. T. GOMOIU, Cercetări chemotaxonomice la plante inferioare II. Pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din alge marine 183

STELA NIŢĂ, R. OLINESCU, G. CIOBA, C. PĂUN, Modificările metabolismului purinelor după iradiere experimentală şi terapeutică 189

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, T. PERJU, Carotinoide din insecte. III. Carotinoide din insecta *Eurydema ornata* 197

St. cerc. biochim., tomul 20, 2, p. 121—240, Bucureşti, 1977

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, T. PERJU, Carotinoide din insecte. IV. Carotinoide din ouă de *Panonychus ulmi* 203

REFERATE GENERALE

CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU, Determinarea semicantitativă a activităţilor enzimatice prin difuzie radială în geluri 209
H.D. SCHELL, M. A. MATEESCU, IRINA CORNOIU, TR. BENŢIA, Elaborarea şi caracterizarea unor preparate enzimatice insolubile aplicabile în analiza şi epurarea apelor uzate 223

RECENZII 231

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 20, nº 2 1977

IULIE—DECEMBRIE

CONTENTS

M. ŞERBAN, The impact of biochemistry with certain fields of agricultural sciences 125

RODICA BÎRNESCU, S. VASU, The nucleic acids from wild strains of *Aspergillus niger* and their mutants. 129

B. BÖHM, SILVIA GABOR, ELENA ZUGRAVU, Lung and alveolar fatty acids in experimental silicosis. 135

VICTORIA COLDEA, Selenium determination in urine by cathodic stripping . . 139

ILEANA DINU, LIANA BOGHIANU, Investigations on the action mechanism of copper in cumulative subacute intoxication. 143

OFELIA GOZIA, M. ŞERBAN, DOINA POPOV, Ultrastructural and biochemical studies of gonads from several species in different developmental stages. IV. Gel-filtration behaviour of water-soluble proteins 149

MAGDALENA LUNGU, S. VASU, Nucleotide composition of ribozomal RNA from. *A. niger*. 155

ŞTEFANIA MARCOVSCHI, DOMNIŢA CRIŞAN, SILVIA VIERU, The effect of benzylpenicillin and chloramphenicol irradiation on the growth of *E. coli* strains 159

VIORICA MOGA, The content in protein nitrogen and water of two species of green algas from different media of life 165

NATALIA MOLDOVEANU, A. RADU, Purification and some physico-chemical characteristics of the mitochondrial malate dehydrogenase 169

CONSTANŢA MUŞOLAN, The action of metabolic inhibitors on nucleic acids in maize leaves 177

GAVRIL NEAMŢU, E. KOCSIS, MARIAN T. GOMOIU, Chemotaxonomic researches in lower plants. II. Carotenoid and chlorophyll pigments in sea algas 183

STELA NIŢĂ, R. OLINESCU, G. CIOBA, C. PĂUN, Modifications of purine metabolism following experimental and therapeutical irradiation. . . . 189

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K.L. SIMPSON, T. PERJU, Insect carotenoids. III. Carotenoids from beetles of *Eurydema ornata*. 197

St. cerc. biochim., tomul 20, 2, p. 121—240 Bucureşti, 1977

V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, Insect carotenoids. IV. Carotenoids from eggs of *Panonychus ulmi*. 203

GENERAL REVIEWS

CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU, Semiquantitative determination of enzymatic activities by radial difusion in gels. 209

H. D. SCHELL, M.A. MATEESCU, IRINA CORNOIU, TR. BENŢIA, Synthesis and characterization of certain immobilized enzymes used in waste waters analysis and depollution 223

REVIEWS 231

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 125–128, (1977)

IMPACTUL BIOCHIMIEI CU UNELE DOMENII ALE ŞTIINŢELOR AGRICOLE

prof. dr. docent MIHAI ŞERBAN

Utilizarea în titlul acestui eseu a termenului de impact tinde să sugereze interpenetraţia tot mai profundă şi complexă a biochimiei cu unele domenii ale ştiinţelor agro-zoo-veterinare.

Dintr-un punct de vedere personal, consider că acest impact se caracterizează prin cîteva trăsături definitorii, cum ar fi: caracterul necesar, de bivalenţă, integrativ şi reversibil.

Astfel, *caracterul necesar* al corelaţiei organice dintre biochimie şi agricultură rezultă, în primul rînd, din conţinutul, esenţa şi obiectivele cincinalului revoluţiei tehnico-ştiinţifice, din forţa sa mobilizatoare, menită să racordeze capacitatea noastră de creaţie ştiinţifică şi tehnologică la sistemul progresului multilateral al societăţii.

În acest context, agriculturii — luată în accepţia sa cea mai largă — îi revin sarcini de maximă importanţă referitoare la realizarea unor creşteri de producţie la plantele de cultură, la îmbunătăţirea conţinutului calitativ al produselor, la crearea unor noi soiuri de plante şi rase de animale dotate cu înalte performanţe biologice etc. În ansamblul realizării unor asemenea solicitări cu implicaţii, deopotrivă, practice şi teoretice, aportul biochimiei — ca domeniu de vîrf al ştiinţei contemporane — se instituie ca o necesitate legică; într-adevăr, ca fundament teoretic şi experimental al biochimiei aplicate, biochimia devine angajată în procesul tot mai amplu şi diversificat de interpenetraţie cu diferite domenii ale ştiinţelor care deservesc agricultura. Valoarea pertinentă a acestei aserţiuni este — pe deplin — nu numai acceptată dar şi înţeleasă şi aplicată.

Pe de altă parte, caracterul necesar al impactului este determinat şi de impetuoasa dezvoltare a biochimiei în ultimul deceniu şi jumătate, dezvoltare care poate fi considerată ca un remarcabil capitol în istoria ştiinţei. Actuala etapă de dezvoltare pe care o parcurge biochimia o putem denumi etapa moleculară şi de sisteme; aceasta este, de fapt, palierul la care trebuie să se realizeze actualmente confluenţa ştiinţifică, osmoza dintre agricultură şi biochimie.

Dar, evidenţierea caracterului necesar al impactului implică — în mod corelativ — şi evidenţierea caracterului său de *bivalenţă*; această bivalenţă se realizează la nivel metodologic şi la nivel conceptual.

Astfel, este îndeobşte recunoscută importanţa metodei în ştiinţă, ca unul din factorii permisivi ai unei optime cercetări teoretice sau experimentale, condiţie care, împreună cu tehnica, asigură calitatea şi validitatea rezultatelor.

Complexitatea tehnico-metodologică amendată de dezvoltarea şi evoluţia ştiinţelor contemporane, de caracterul pluridisciplinar al unui domeniu dat, impune criteriul metodologic al investigaţiei ştiinţifice

ca un parametru care decide audienţa unei cercetări sau eliminarea ei. Este unanim recunoscut fenomenul de pătrundere şi extindere a metodelor şi conceptelor experimentale ale biochimiei în diferite domenii ale biologiei aplicate, pînă la apariţia interpenetraţiei teoretice şi faptice, fenomen ilustrat cu pregnanţă şi în unele domenii ale ştiinţelor agro-zooveterinare. Sub acest raport, biochimia se instituie şi ca un instrument metodologic al biologiei aplicate la agricultură, domeniu în care coeficientul de penetraţie capătă o valoare din ce în ce mai ridicată.

Rezultă implicit că cercetarea agricolă, atît în sectorul vegetal cît şi în cel zoo-veterinar, reclamă o constelaţie de metode şi tehnici biochimice de mare performanţă analitică, menite să surprindă şi să cantivizeze modificări discrete la nivel molecular, cu semnificaţii profunde pentru abordarea, înţelegerea şi interpretarea fenomenologică a materiei vii. Astfel, biochimia analitică modernă devine o componentă necesară a geneticii, a ameliorării plantelor şi animalelor, a nutriţiei plantelor şi animalelor domestice, a unor tehnologii de păstrare şi conservare a legumelor şi fructelor, a patologiei veterinare etc.

În această paletă largă, biochimia analitică se constituie ca atribut metodologic indispensabil pentru caracterizarea chimică calitativă şi cantitativă a materialului biologic investigat în diferite condiţii experimentale.

Totodată, raporturile mutuale, biunivoce ale biochimiei cu diferite domenii ale ştinţelor agricole trebuie să se realizeze şi în sfera unor cercetări de *concepţie*, *integrative* elaborate şi abordate de pe o platformă ştiinţifică *comună*; asemenea problematici complexe, de concepţie, capabile să ofere opţiuni şi soluţii, trebuie să răspundă unor cercetări cu caracter aplicativ şi de dezvoltare, pe care progresul alert al agriculturii noastre le pune, deopotrivă, în faţa specialistului în diverse domenii ale agriculturii şi a biochimistului. Astfel, numai abordarea de pe o asemenea platformă comună, în cadrul unei concepţii şi strategii *integrate*, poate optimiza procesul de corelaţie interdisciplinară, ca premisă certă pentru creşterea aportului ştiinţei şi tehnologiei la dezvoltarea producţiei agrozootehnice.

Desigur însă că impactul biochimiei cu unele domenii de profil agricol — care conferă în această etapă un conţinut mai amplu, mai complex şi mai profund al interpenetraţiei biochimiei în aceste domenii — trebuie să reflecte şi anumite noi raporturi de *reversibilitate* (opţiunea pentru acest termen nu presupune o deformaţie profesională, ci sublinierea caracterului său dinamic, funcţional) între specialistul în agricultură şi chimist; aceastea trebuie să devină relaţii de esenţă, de fertilizare reciprocă, bazate pe necesitatea unei cooperări depline şi a valorificării ideilor, a creativităţii şi a cutezanţei ambilor parteneri angrenaţi în soluţionarea colectivă a problematicii ştiinţifice.

În context, se impune şi abordarea unei probleme de atitudine referitoare la poziţia şi rolul biochimiei în cercetarea agricolă. Această abordare implică luarea în considerare a următorului truism : necesitatea cunoaşterii, înţelegerii şi interpretării fenomenelor vitale la nivel infracelular, macromolecular şi molecular a contribuit la recunoaşterea şi consolidarea rolului biochimiei în fundamentarea procesului biologic. Acest rol nu trebuie însă absolutizat, înţeles sau aplicat în mod exclusi-

vist, unilateral. Biochimia poate și trebuie să-și aducă o contribuție esențială numai în strînsă corelație funcțională cu celelalte domenii conexe care investighează organismul vegetal și animal. Aceste domenii oferă biochimiei spre investigare nu numai „cazul" per se, ci și fondul și unii parametri ai experimentului biologic; extrapolată în limbaj cibernetic, aceasta înseamnă că teoria și practica agricolă oferă biochimiei un anumit tip de „program", iar biochimia, în cooperare cu domeniile respective, contribuie la soluționarea și optimizarea acestui program. Totodată, datele și concluziile științifice pe care biochimia le furnizează reprezintă posibilități de interpretare plurifactorială a procesului investigat și constituie noi premise pentru extinderea și aprofundarea unei anumite problematici. În acest sens trebuie apreciat raportul dialectic dintre biochimie și disciplinele agricole conexe, precum și valoarea euristică a acestui raport. Numeroase exemple din domeniul geneticii, fiziologiei, ameliorării, medicinii veterinare etc., ilustrează această idee a integrării multidisciplinare.

Aceste cîteva considerații generale creează cadrul pentru a formula una din direcțiilor fundamentale, de concepție, a interacțiunii biochimiei cu agricultura în etapa actuală și imediat următoare. Această direcție o reprezintă problema *mecanismelor moleculare de reglare și control metabolic*, problemă cardinală, dominantă care definește orientarea actuală și de perspectivă a biochimiei moderne; în consecință — după opinia noastră — aceasta trebuie să reprezinte zona de impact a biochimiei cu toate domeniile biologiei aplicate și, în speță, cu agricultura.

În concepția actuală, nivelul molecular de cercetare a procesului biologic nu trebuie înțeles sau interpretat metafizic, ca o simplă „dimensiune" de investigare a procesului respectiv. Acest nivel, cu toate inferențele sale, se supune anumitor legități, manifestarea sa fiind condiționată de ansamblul sistemului în care subsistă angrenajul molecular. Rezultă implicit că nivelul molecular reprezintă, de fapt, un subsistem care trebuie înțeles și interpretat nu ca o entitate separată, distinctă, ci ca o componentă a unui ansamblu complex, integrat și coordonat.

Abordarea interdisciplinară a cercetărilor la acest nivel prezintă o vădită importanță, deoarece permite aprofundarea și elucidarea proceselor biochimice ca o expresie a unei laturi mai profunde a organizării moleculare, macromoleculare și funcționale a celulei. De aceea, semnificația unei asemenea abordări moderne a multiplelor probleme care interesează agricultura apare cu atît mai necesară cu cît investigarea acestui nivel reprezintă puntea de legătură dintre chimic și biologic.

Modelul de reglare și control la nivel molecular actualmente cel mai investigat se referă la funcționalitatea anumitor secvențe de reacții enzimatice. Controlul metabolic al unor căi multienzimatice este asigurat prin acțiunea cooperantă a mai multor tipuri de enzime, precum și prin efectori multipli sau produși de reacție a căror amploare este dependentă de condiții fiziologice. Efectul de reglare se exercită în anumite verigi „cheie" ale secvenței de reacții, determinînd activarea, diminuarea sau inhibarea întregului proces. Coordonarea precisă a acestei activități în diferite momente și condiții ale existenței celulei explică paradoxul aparent dintre diversitatea activității biochimice și „stabilitatea" dinamică a celulei.

Mecanismele moleculare de reglare şi control a activităţii celulare stau la baza tuturor evenimentelor biochimice ale ambianţei metabolice şi, prin intermediul lor, secvenţele de reacţii biochimice — biosinteze şi degradări — devin riguros orientate, intercondiţionate, coordonate şi ajustate cu supleţe necesităţilor metabolice. La acest nivel se impun a fi depistate şi elucidate modificări şi comportări induse de complexul multifactorial care acţionează asupra organismului animal sau vegetal, în scopul precizării bazelor biochimice ale proceselor de îmbunătăţire a însuşirilor biologice ale plantei şi animalului.

Principalele căi experimentale prin care se poate aborda problema reglării şi controlului metabolic la nivel molecular sînt următoarele:

— controlul şi reglarea prin mecanisme de cinetică enzimatică şi de modulare a activităţii acestora;
— controlul şi reglarea prin proprietăţile moleculare ale enzimelor, cu referire specială la aspectele de inducţie şi represie, interacţiuni allosterice şi polimorfism enzimatic;
— controlul şi reglarea prin compartimentarea intracelulară a enzimelor;
— controlul şi reglarea prin sistemul cu doi mesageri chimici.

Mecanismele moleculare de reglare şi control metabolic reflectă determinismul şi coordonarea ansamblului de reacţii biochimice care condiţionează — la nivel integrat — specificul a ceea ce, în mod atît de simplu, denumim materie vie. Aceste mecanisme reprezintă astfel unul din obiectivele majore ale biochimiei contemporane, cu profunde rezonanţe pentru teoria şi practica agro-zoo-veterinară.

Ca încheiere, o singură remarcă concluzivă: această expunere, care a fost concepută în sensul evidenţierii şi nuanţării filozofice a unor aspecte de principiu referitoare la corelaţia biochimiei cu agricultura, a avut ca principală intenţie şi scop servirea ideii de necesitate şi de funcţionalitate a acestei corelaţii. De aici decurge implicit şi responsabilitatea noastră socială ca făuritori ai cincinalului revoluţiei tehnico-ştiinţifice.

Prezentat la redacţie
20 aprilie 1977

Institutul Agronomic
„N. Bălcescu", Catedra de chimie,
Bucureşti

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 129—134, (1977)

ACIZII NUCLEICI DIN UNELE TULPINI ŞI MUTANTE DE *ASPERGILLUS NIGER*

RODICA BÎRNESCU, S. VASU

Rezumat. — S-au extras şi purificat acizii nucleici (cu fenol-8-hidroxichinolină, în prezenţă de bentonită şi sodiu-dodecil-sulfat) din două tulpini sălbatice de *A. niger* (ICA-34 şi G_2) şi două mutante (G_2-58 şi G_2-61) cu activitate nucleazică diferită, cultivate în condiţii de suprafaţă şi agitate. Analiza electroforetică a acizilor nucleici, în gel de poliacrilamidă-agaroză, nu indică degradări accentuate ale diferitelor specii moleculare de DNA şi RNA, în cazul tulpinilor şi mutantelor cu activitate nucleazică mare (ICA-34 şi G_2-61). În urma electroforezei acizilor nucleici, între tulpinile sălbatice şi mutantele folosite se constată diferenţe la nivelul unor specii moleculare minore de RNA, iar în unele probe (în special ICA-34 şi G_2-61 provenite din culturi agitate) se identifică o fracţie cu migrare electroforetică mai mare decît a t-RNA, care se colorează metacromatic cu albastru de toluidină şi care pare să fie de natură polifosfatică.

În creşterea şi dezvoltarea fungului *A. niger* se produc modificări cantitative şi calitative ale acizilor nucleici*, atît într-o fază timpurie a creşterii miceliului cît şi în timpul formării conidioforului (1) (2) (3). Aceste modificări sînt însoţite de variaţii relativ mari ale activităţii -DN-azelor şi RN-azelor intra- şi extracelulare (3)(4).

Urmărind acizii nucleici obţinuţi din fracţiuni subcelulare, separate din celulele hifale de *A. niger* (2) (5), s-a arătat că RNA microzomali, respectiv r-RNA citoplasmatici sînt diferiţi de r-RNA mitocondriali şi că în general RNA, fracţionaţi pe cale electroforetică — în gel de agaroză sau poliacrilamidă-agaroză —, se dovedesc a fi mai eterogeni decît s-a stabilit prin ultracentrifugare în gradient de zaharoză (6).

Pe de altă parte activitatea DN-azică şi RN-azică a unor tulpini şi mutante de *A. niger*, obţinute în urma iradierii sporilor cu raze gama s-a dovedit (7) a fi foarte diferită şi uneori cu mult mai mare în culturile agitate faţă de cele de suprafaţă.

În aceste condiţii, ne-am propus să obţinem şi să caracterizăm acizii nucleici din miceliul unor tulpini sălbatice şi mutante de *A. niger*, cu diferite activităţi nucleazice, folosind culturi agitate şi de suprafaţă. Analiza electroforetică a acizilor nucleici indică diferenţe între tulpinile sălbatice şi mutante, la nivelul unor specii moleculare minore de RNA şi totodată, prezenţa în unele probe a unei fracţiuni cu migrare electroforetică mai mare decît a t-RNA care pare să fie de natură polifosfatică.

---

* Se folosesc următorele prescurtări: DNA pentru acizii desoxiribonucleici; RNA — pentru acizii ribonucleici, respectiv r-RNA (robozomali), t-RNA (de transfer); DN-aze pentru desoxiribonucleaze şi RN-aze pentru ribonucleaze.

MATERIALE ŞI METODE

S-au folosit tulpinile sălbatice *A. niger* ICA-34 (colecţia ICICA-Bucureşti) şi *A. niger* G_2 (colecţia ISB-Bucureşti), precum şi mutantele G_2 — 58 şi G_2—61, selecţionate în urma iradierii sporilor cu raze gama (8); A. niger G_2 şi mutanta G_2—58 prezintă o slabă activitate DN-azică şi RN-azică, în schimb *A. niger* ICA-34 şi mutanta G_2—61 indică activităţi accentuate ale acestor enzime (7). *A. niger* ICA-34, în culturi agitate manifestă activităţi RN-azice mai mari decît în culturi de suprafaţă.

S-au obţinut culturi de suprafaţă şi agitate (agitare rotativă, 150 rot/min) pe mediul Raulin după 3—4 zile de la însămînţare.

Extracţia şi purificarea acizilor nucleici s-a efectuat în prezenţă de bentonită şi sodiu-dodecil-sulfat (SDS) 1% cu fenol 90%—8-hidroxichinolină 0,1%, folosind ca tampon de extracţie Tris, 0,005 M-NaCl 0,05 M — bentonită 0,05% pH 7,6 (1/10, g/v) în condiţiile arătate în lucrări anterioare (2) (3).

Estimarea acizilor nucleici s-a realizat prin măsurarea DO_{260nm} şi DO_{280nm} (spectrofotometrul VSU 2-P, C. Zeiss) după solubilizarea lor în tampon Tris, 0,005 M—NaCl, 0,05 M pH 7,6; spectrele de adsorbţie s-au trasat la Specord UV—VIS (C. Zeiss).

Electroforeza acizilor nucleici în gel de poliacrilamidă 2,5% — agaroză 0,5% (9), pe suport de sticlă, s-a realizat în sistem orizontal (10) (11); plăcile de gel conţineau acrilamida-N,N' metilendiacrilamidă în raport 95/5, tampon Tris — Na_2-EDTA — acid boric (1.08—0,093 — 0,55 g/l) pH 8,3 (9), 0,033 ml N,N, N', N'-tetrametiletilendiamină şi 0,33 ml persulfat de amoniu 10% /g arilamidă, după Loening (12). Acizii nucleici s-au colorat cu albastru de toluidină (11).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Acizii nucleici extraşi şi purificaţi, cu fenol-8-hidroxichinolina în prezenţă de bentonită şi sodiu-dodecil-sulfat, indiferent că provin din miceliul tulpinilor sălbatice sau mutantele de *A. niger*, cultivate agitat sau în culturi de suprafaţă, indică spectre de adsorbţie (fig.1) caracteristice: — cu un maxim de adsorbţie la 260 ± 2 nm şi un minim în jur de 235 nm (13).

Rapoartele DO_{280nm}/DO_{260nm} (tabela 1) pentru probele de acizi nucleici, cu excepţia celor obţinuţi din miceliul provenit din cultura agitată de *A. niger* ICA-34, este cuprins între 0,52—0,61, fiind deci cu ceva mai mari faţă de 0,46—0,49, găsite în cazul acizilor nucleici extraşi din alte surse (14); menţionăm în acest sens că extracţii repetate cu fenol-8-hidroxichinolină, de 3 sau chiar 4 ori, nu au condus în cazul acizilor nucleici obţinuţi din miceliul total de A. niger (3) (15) la scăderea raportului menţionat sub 0,48—0,50, decît rareori.

Analiza electroforetică a acizilor nucleici din miceliul tulpinilor sălbatice şi mutantelor de *A. niger* (fig. 2) nu indică diferenţe mari. Cu toate că activitatea DN-azică intracelulară şi RN-azică intra- şi extracelulară a acestor tulpini şi mutante este diferită (7), speciile moleculare majore, respectiv DNA (prima fracţie după start), r-RNA (următoarele două fracţii bine conturate) şi t-RNA (cea mai îndepărtată fracţie de RNA faţă destrat) sînt practic bine reprezentate în toate probele de acizi nucleici.

Se remarcă însă diferenţe în ceea ce privesc speciile moleculare minore de RNA. Astfel, în tulpina sălbatică *A. niger* ICA-34 apar două fracţii de RNA în regiunea 6,2—7,2 cm de la strat, destul de bine conturate; la suşa sălbatică *A. niger* G_2 şi mutantele G_2—58 şi G_2—61 nu se evidenţiază în aceasta regiune decît o singură fracţie de RNA, care migrează la o distanţă de 6,7—6,9 cm faţă de strat. Aceste specii moleculare de RNA se plasează în gelul de poliacrilamidă-agaroză aproximativ în

regiunea în care migrează RNA de greutate moleculară corespunzătoare unui coeficient de sedimentare $S_{20} \approx 8{,}0$ (Serva), pe care l-am folosit ca referință în experiențele noastre (fig. 2—proba *b*). Celălalt produs de referință, r-RNA din ficat de bovine (Koch Light Lab.) — din fig. 2 proba *a* — nu ne-a dat rezultate satisfăcătoare, probabil datorită unui proces de degradare pe care l-a suferit.

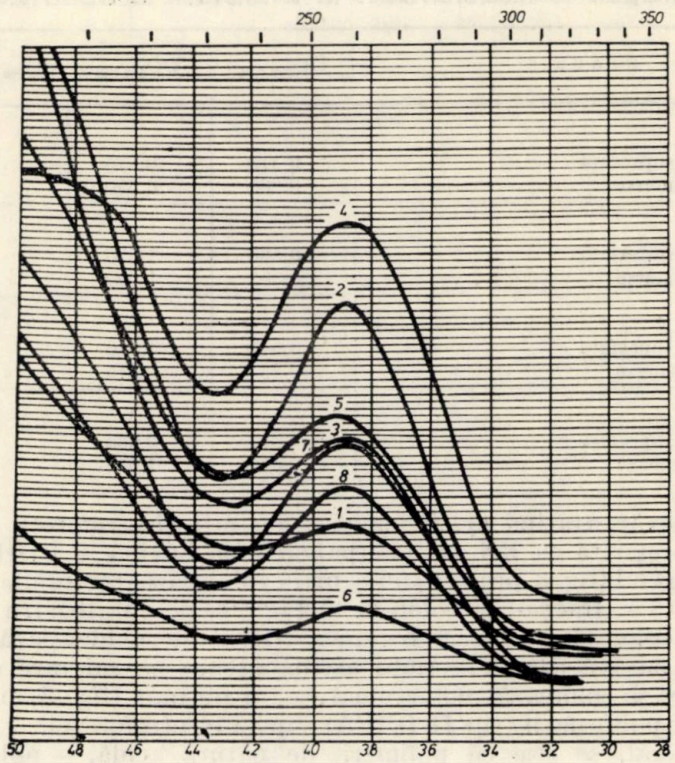


Fig. 1 — Spectrele de adsorbție în UV ale acizilor nucleici extrași și purificați din micelul de *A. niger*;
(numerele impare indică culturile de suprafață, cele pare culturile submerse; 1 și 2 *A. niger* ICA-34; 3 și 4 *A. niger* G_2; 5 și 6 *A. niger* 58; 7 și 8 *A. niger* 61).

În cazul tuturor probelor de acizi nucleici analizate, și mai ales în cele provenite din miceliile cultivate agitat, după cum se vede din fig. 2, apare în plus o fracție la cca 10—10,8 cm de la start. Această fracție, cu mobilitatea electroforetică mai mare decît a t-RNA, este mai accentuată în probele obținute din *A. niger* ICA-34 și în special pentru mutanta G_2-61.

Spre deosebire de diferitele fracțiuni de acizi nucleici, evidențiate în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă-agaroză, care se colorează cu albastru de toluidină orto-cromatic, fracțiunea cu migrare electroforetică mai mare decît t-RNA se colorează metacromatic. Era deci posibil

ca această fracţiune să nu corespundă unor polinucleotide. Într-o lucrare anterioară (2), am arătat că fracţiunea colorată metacromatic rămîne bine evidenţiată, chiar dacă se aplică gelului — după electroforeza acizilor nucleici — un tratament cu RN-ază.

Tabela 1

Caracterizarea spectrofotomerică a acizilor nucleici extraşi şi purificaţi din miceliul unor suşe sălbatice şi mutanţi de *A. niger* (acizi nucleici izolvaţi pentru electroforeză, au fost diluaţi de 100–300 ori în vederea determinărilor spectrofotometrice)

Proba	$DO_{280\ nm}$	$DO_{260\ nm}$	$DO_{280\ nm}/DO_{260\ nm}$
A. niger			
— culturi de suprafaţă	0,415	0,675	0,61
— culturi submerse	0,300	0,650	0,46
A. niger G_2			
— culturi de suprafaţă	0,580	1,070	0,54
— culturi submerse	0,565	1,000	0,56
A. niger 58			
— culturi de suprafaţă	0,545	1,040	0,52
— culturi submerse	0,430	0,815	0,52
A. niger 61			
— culturi de suprafaţă	0,370	0,635	0,58
— culturi submerse	0,545	1,002	0,54

Într-adevăr, tratînd acizii nucleici separaţi electroforetic cu hîrtie de filtru impregnată cu RN-ază (2) (pancreatică bovină — BDH) şi colorînd ulterior gelul (fig. 3, proba 9) nu se mai evidenţiază fracţiunile de RNA ; în schimb, DNA, fracţiunea colorată metacromatic cu albastru de toluidină şi una colorată similar în regiunea t-RNA se evidenţiază şi după tratamentul cu RN-ază. Fracţiuni asemănătoare ca migrare electroforetică, şi care se colorează metacromatic, am obţinut (fig. 3, probele 10 şi 11) pentru polifosfaţii (tip II-ICICA) supuşi electroforezei.

În general, se ştie că polimerii de natură acidă, — poliglucidele acide, polifosfaţii etc., — pot fi coloraţi metacromatic cu albastru de toluidină (16).

Într-o lucrare anterioară (15), am arătat că RNA, obţinuţi din supernatantul postmitocondrial din *A. niger* ICA-34, conţin un component poliglucidic care se poate separa prin gelfiltrare prin Sephadex G-100. Acest poliglucid însă nu migrează în gelul de poliacrilamidă-agaroză (15).

Este deci posibil ca fracţiunea cu migrare electroforetică mai mare decît t-RNA, care se colorează metacromatic cu albastru de toluidină, identificată mai ales în cazul probelor de acizi nucleici extraşi din miceliul cu activitate RN-azică mare (*A. niger* ICA-34 şi G_2-61) să corespundă unor polifosfaţi şi să nu fie de natură polinucleotidică.

De fapt, Belozerski şi Kulaev (17) precum şi Yanagita şi Kogane (18), urmărind în *A. niger* diferiţi compuşi ai fosforului, indică existenţa mai multor fracţiuni polifosfatice, dintre care una acidoinsolubilă legată de acizii nucleici şi alta acido-solubilă ; prima ar avea rol în sinteza protei-

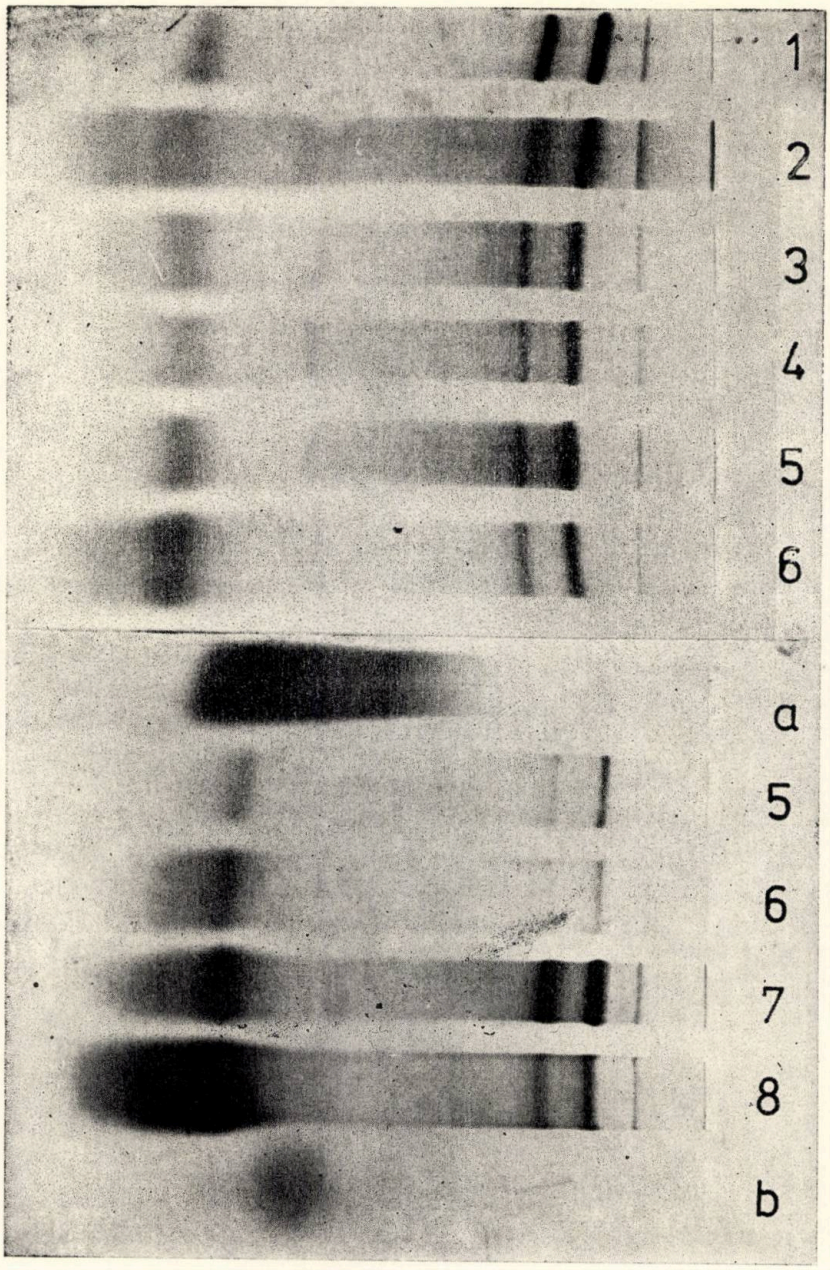


Fig. 2. — Fracționarea electroforetică a acizilor nucleici din unele suşe sălbatice şi mutanți de *A. niger*, cultivat submers şi în culturi de suprafață ;
(gel poliacrilamidă 2,5 % — agaroză 0,5 % ; 3 ore la 200—300 V, 1—1,6 mA/cm ; numerele impare indică culturile de suprafață, cele pare culturile submerse : 1 şi 2 *A. niger* ICA—34 ; 3 şi 4 *A. niger* G_2 ; 5 şi 6 *A. niger* 58 ; 7 şi 8 *A. niger* 61 ; a. r-RNA din ficat de bovine-Koch Light Lab. — şi b. RNA de greutate moleculară mare p.a.—Serva—).

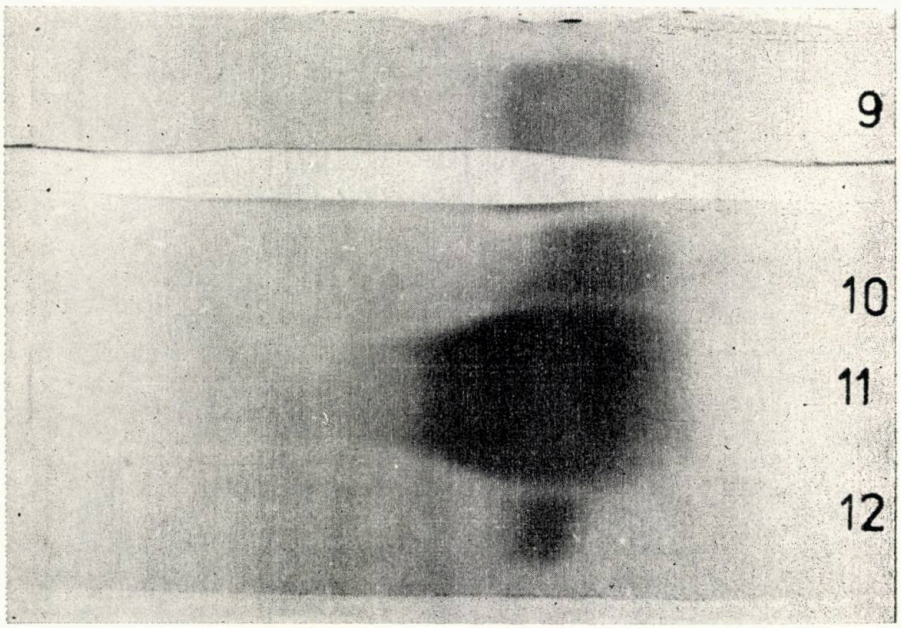


Fig. 3. — Tratament cu RN-ază a acizilor nucleici fracționați electroforetic și electroforeza polifosfaților; (pentru condițiile de electroforeză vezi fig. 2; proba 9 — după separarea electroforetică a acizilor nucleici din G_2—61 gelul a fost tratat cu hîrtie impregnată cu RN-ază, timp de 30 min. și apoi a fost colorat; polifosfați: 100 μg — proba 10 și 1 000 μg — proba 11; 12—40 μg RNA—KEPEC).

nelor şi a RNA, iar cea de a doua ar constitui o rezervă de fosfor şi de energie folosită în celulă în scopuri sintetice (17). În acelaşi sens s-ar putea interpreta şi colorarea metacromatică, cu albastru de toluidină, a granulelor de volutină, identificate în multe microorganisme, care conţin polifosfaţi şi servesc ca depozit de fosfor şi energie pentru procesele sintetice celulare (19).

CONCLUZII

1. Acizii nucleici, extraşi şi purificaţi cu fenol-8-hidroxichinolină în prezenţă de bentonită şi sodiu dodecilsulfat, analizaţi electroforetic în gel de poliacrilamidă-agaroză, nu indică degradări accentuate ale diferitelor specii moleculare de DNA şi RNA, cu toate că au fost obţinuţi din micelii de *A. niger* cu activităţi nucleazice mari (G_2-61 şi ICA-34) sau mici (G_2 şi G_2-58).

2. Între tulpinile sălbatice şi mutantele folosite se constată diferenţe la nivelul unor specii moleculare minore de RNA.

3. În urma electroforezei acizilor nucleici, se identifică o fracţie cu migrare electroforetică mai mare decît a t-RNA, care se colorează metacromatic cu albastru de toluidină şi care pare să fie de natură polifosfatică.

Prezentat la redacţie la 10 iunie 1977

Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti

THE NUCLEIC ACIDS FROM WILD STRAINS OF *Aspergillus Niger* AND THEIR MUTANTS

(SUMMARY)

The nucleic acids from two wild strains (ICA-34 and G_2) and two mutants (G_2-58 and G_2-61) of *A. niger*, showing different RN-ase activities, were purified by phenol extraction in the presence of bentonite and sodium-dodecyl-sulfate. The fungus was grown in shaken as well as surface culture. As shown by the nucleic acid pattern following electrophoresis in polyacrylamide-agarose composite gels there was no apparent degradation of the different RNA species from the strains and mutants exhibiting a higher RN-ase activity (ICA-34 and G_2—61). The electrophoretic pattern of nucleic acids from the wild strains and the mutants used in this work showed only slight differences in the region contaning some minor RNA species and in the case of ICA-34 and G_2-61 a fraction with a higher mobility than *t*-RNA was visible. This fraction is stained methachromatically by the toluidine blue and seems to be a polyphosphate.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Wake, T. Yamashita, S. Sasaki, J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., V, *8*, 221 (1965).
2. S. Vasu, Rev. roum. Biochim, **4**, 219 (1967).
3. S. Vasu, S. Rădulescu, St. cerc. biochim., **14**, 339 (1971).
4. Snagasaki, J. Gen. Appl. Microbiol., **14**, 147 (1968).
5. S. Vasu, L. Botoşeneanu, M. Dedu, R. Bîrnescu, Comunicare în sesiunea anuală de comunicări ştiinţifice ICEBIOL (aprilie 1976).
6. R.C. Mayer, R. Storck, Arch. Biochem. Biophys., **104**, 193 (1964).
7. S. Vasu, C. Muşolan, L. Botoşeneanu, Rev. roum. Biochim., **2**, 133 (1977).
8. I. Gomoiu, V. Lazăr, S. Vasu, Comunicare în Sesiunea anuală de comunicări ştiinţifice ICEBIOL (aprilie 1976).
9. A.C. Peacock, C. W. Dingman, Biochemistry, **7**, 668 (1968).
10. S. Vasu, St. cerc. biochim., **12**, 393 (1969).
11. S. Vasu, St. cerc. inframicrobiol., **22**, 459 (1971).
12. U.E. Loening, Biochem. J., **102**, 251 (1967).
13. J.N. Davidson, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman Hall, Science Paperbooks, 1972, p. 92.
14. R. Portocală, L. Popa, *Acizii ribonucleici celulari şi virali*, Ed. Acad. R.S.R., 1966, p. 323.
15. S. Vasu, St. Hulea, Rcv. roum. Biochim., **8**, 167 (1971).
16. J. Chayen, L. Bitensky, R. Butcher, L. Poulter, *A guide to practical histochemistry*, Oliver & Boyd, Edinburg, 1969.
17. A.N. Belozerski, I.S. Kulaev, Biochimia, **22**, 29 (1957).
18. T. Yanagita, F. Kogane, J. Gen. Appl. Microbiol., **9**, 313 (1963).
19. A.H. Rose, *Chemical Microbiology*, Butterworths, London (1968).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 135—138, (1977)

ACIZII GRAŞI DIN ŢESUTUL PULMONAR ŞI SURFACTANTUL ALVEOLAR ÎN SILICOZA EXPERIMENTALĂ

B. BÖHM, SILVIA GABOR, ELENA ZUGRAVU

Rezumat. — S-a studiat efectul cuarţului asupra conţinutului de lipide în ţesutul pulmonar şi în surfactant la şobolanii injectaţi intratracheal. Surfactantul alveolar a fost obţinut prin lavaj endoalveolar cu ser fiziologic. Acizii graşi au fost determinaţi atît din cantitatea totală de lipide cît şi din fracţiunea fosfolipidică.

În ultimele două decenii obiectivul principal în studiul biochimic al patogeniei silicozei a fost metabolismul protidic. Este cunoscut că în procesul evolutiv al silicozei, în ţesutul pulmonar creşte concentraţia colagenului (1), (2), ceea ce se reflectă prin creşterea concentraţiei aminoacizilor : hidroxiprolină şi hidroxilizină — aminoacizi care se găsesc în ţesutul pulmonar în exclusivitate în compoziţia colagenului.

În ultimii ani încep să apară numeroase lucrări care studiază metabolismul lipidic al plămînului (3)—(7). S-a constatat că metabolismul lipidic suferă modificări semnificative chiar în primele săptămîni ale acţiunii pulberii de cuarţ (8), pe cînd schimbările metabolismului protidic devin evidente abia într-o fază mai avansată a bolii. Lucrările lui Grünspan (9) şi Heppleston (10) au evidenţiat creşterea pronunţată a cantităţii acidului palmitic şi a fosfolipidelor — în special al fosfatidilcolinei atît în plămîn cît şi în surfactantul pulmonar la şobolani albi în condiţii de silicoză experimentală.

MODUL DE LUCRU

Trei loturi de şobolani albi cu o greutate de 180 g s-au instilat intratracheal.

1. cu o suspensie de 30 mg SiO_2 (DQ).
2. cu o suspensie de 30 mg Al_2O_3 — praf considerat inert — în 1 ml de ser fiziologic.
3. cu 1 ml ser fiziologic — lot martor.

După 1,3 respectiv 6 luni animalele au fost sacrificate prin secţionarea aortei abdominale Surfactantul pulmonar s-a izolat prin spălări repetate cu ser fiziologic.

Extracţia lipidelor a decurs în felul următor, folosind ca indicaţii lucrarea lui Folch(11) şi a lui Rauser (12) :0,5 g ţesut sau 0,5 ml extract de surfactant se tratează cu 5 ml de amestec cloroform-metanol (2 :1), conţinînd 0,025 mg/ml hidrochinonă. Se omogenizează amestecul într-un omogenizator. Se filtrează rapid la vid printr-o pîlnie G_4 cu placă poroasă. După trecerea amestecului, pîlnia se mai spală cu 5 ml amestec cloroform-metanol (2 :1). Filtrarea se face direct într-un tub de cetrifugă cu capac înşurubabil. Filtratului i se adaugă 2,3 ml soluţie clorură de magneziu 0,034%. După o agitare intensă se centrifughează timp de 15 minute la 3 000—4 000 r.p.m. la 4°C. Faza superioară se îndepărtează prin aspirare. Stratului inferior i se adaugă apoi faza superioară (obţinută prin separarea într-o pîlnie de separare) a unui amestec compus din cloroform-metanol-clorură de magneziu 0,034% (8 :4 :3) în proporţie de 1 ml fază superioară pentru 3 ml lichid din eprubetă. După o agitare intensă se repetă centrifugarea. Acea-

stă operaţiune se mai repetă o dată după îndepărtarea fazei superioare. În final, după ultima spălare a extractului, faza superioară se îndepărtează, se adaugă metanol pînă ce apare un nor alb, care dispare prin adăugarea a încă cîteva picături de metanol. Extractul astfel obţinut se evaporă cu un evaporator rotativ, în atmosferă inertă, iar reziduul se solvă într-un ml de cloroform-metanol (2 :1).

Separarea fracţiunilor fosfolipidice de lipide neutre s-a făcut prin cromatografie pe strat subţire pe plăci de Silica Gel 20 × 20 cm de 0,25 mm grosime (thickness) folosind ca solvent de migrare o soluţie compusă din dietileter-benzen-etanol-acid acetic (40 :50 :2 :0,2) (13). Din fracţiunea fosfolipidică precum şi din extractul global — după o hidroliză alcalină (4) urmată de o esterificare cu o soluţie metanolică de BF_3 (14) — s-au separat esterii acizilor graşi prin tehnica gaz-lichid cromatografică. Condiţiile de lucru a gazcromatografului: gaz purtător azot (35 ml/min), detector F.I.D., coloană de oţel inoxidabil cu diametrul interior de 2 mm şi o lungime de 1,5 m, umplută cu DEGS 20 % pe cromosorb silanizat 60—80 mesh. Temperatura de lucru a coloanei a fost de 190°C, iar a detectorului şi vaporizatorului de 230°C. Tipul aparatului Carlo Erba.

Din aceste extracte s-au exprimat cantitativ următorii acizi graşi: lauric, miristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic şi arachidonic.

Rezultatele exprimate procentual, considerînd suma acestor acizi graşi 100 % sînt redate în tabelele 1, 2, şi 3, 4.

Tabela 1

Compoziţia procentuală în acizi graşi a fracţiunii fosfolipidice

Acizii graşi	Luna	Martor	Al_2O_3	SiO_2
lauric	I	1,54	0,99	0,39
	III	0,64	1,14	1,61
	VI	0,17	0,62	0,45
miristic	I	4,20	3,30	5,30+
	III	3,10	4,00	5,60+
	VI	4,38	2,37	4,80
palmitic	I	36,90	36,20	59,00+
	III	33,40	36,00	51,30+
	VI	37,10	40,80	51,90
palmitoleic	I	5,80	5,60	6,20
	III	4,90	5,60	6,80
	VI	6,40	3,90	4,70
stearic	I	13,20	11,50	6,10+
	III	12,90	19,00	10,10+
	VI	12,90	13,25	7,90+
oleic	I	15,60	14,20	9,30+
	III	17,00	14,80	11,40+
	VI	15,30	15,40	9,30+
linoleic	I	4,40	6,70	3,90
	III	4,80	5,20	4,60
	VI	3,10	4,40	3,80
arachidonic	I	12,70	13,00	9,70
	III	19,40	14,10	9,40
	VI	13,50	14,30	16,30

+ = $p \ll 0{,}01$

Tabela 2

Compoziţia procentuală în acizi graşi a fracţiunii fosfolipidice în surfactant

Acizii graşi	Luna	Martor	Al_2O_3	SiO_2
lauric	I	3,25	3,19	3,17
	III	2,27	2,96	1,29
	VI	3,75	7,08	2,60
miristic	I	10,30	13,40	9,10
	III	11,30	5,30	6,50
	VI	7,47	8,04	3,95
palmitic	I	32,40	26,40	63,80+
	III	44,70	37,10	57,50+
	VI	34,70	49,15	61,00+
palmitoleic	I	4,20	10,00	8,40
	III	9,40	9,50	7,20
	VI	6,65	4,95	5,96
stearic	I	5,30	7,00	4,10
	III	5,00	8,40	4,30
	VI	4,64	8,48	3,85
oleic	I	6,80	11,50	6,70
	III	10,30	10,80	8,90
	VI	7,33	12,25	18,85
linoleic	I	12,80	9,80	2,60
	III	7,80	10,50	6,10+
	VI	5,11	4,84	5,40
arachidonic	I	21,60	5,90	5,90
	III	3,10	7,80	6,90
	VI	7,18	14,51	12,80

+ = $p \ll 0{,}01$

Tabela 3

Compoziţia procentuală în acizi graşi totali din plămîni

Acizii graşi	Luna	Martor	Al_2O_3	SiO_2
lauric	I	0,32	0,42	0,29
	III	0,28	0,61	1,26
	VI	0,95	0,66	0,71
miristic	I	2,28	2,88	4,71
	III	2,23	3,91	4,06+
	VI	1,40	3,30	5,03+
palmitic	I	31,11	38,17	55,56+
	III	26,60	32,02	44,12+
	VI	31,20	34,67	45,73+
palmitoleic	I	5,87	6,66	6,84
	III	6,17	7,00	4,44
	VI	2,38	6,02	4,27
stearic	I	15,47	16,76	9,02+
	III	16,10	12,80	10,84
	VI	14,98	14,12	7,88+
oleic	I	22,30	14,31	8,78+
	III	24,00	22,50	14,15+
	VI	25,10	21,37	13,37+
linoleic	I	11,17	6,26	4,91+
	III	7,17	5,71	5,48
	VI	4,72	6,20	3,63
arachidonic	I	8,97	9,74	6,42
	III	16,20	10,40	15,50
	VI	11,70	15,75	17,00

$+ = p \ll 0{,}01$

Tabela 4

Compoziţia procentuală în acizi graşi totali din surfactant

Acizi graşi totali	Lune	Martor	Al_2O_3	SiO_2
lauric	I	2,93	1,37	0,54
	III	2,27	2,96	1,29
	VI	1,76	6,45	2,43
miristic	I	6,55	2,50	5,85
	III	3,95	6,82	5,54
	VI	4,24	10,60	5,47
palmitic	I	41,86	31,83	52,20+
	III	35,90	42,22	51,30+
	VI	49,92	54,40	56,00+
palmitoleic	I	10,44	13,80	9,18
	III	9,90	10,38	10,61
	VI	7,52	5,66	8,98
stearic	I	15,25	19,67	7,30+
	III	12,30	14,02	8,82+
	VI	8,04	9,00	4,60+
oleic	I	9,36	9,11	7,82
	III	11,82	13,30	9,50+
	VI	15,73	12,06	13,10
linoleic	I	5,75	8,92	5,48
	III	5,40	5,66	4,30+
	VI	4,74	5,65	3,70
arachidonic	I	9,72	6,44	11,80+
	III	4,34	3,95	6,73
	VI	12,74	9,07	7,67

$+ = p \ll 0{,}01$

CONCLUZII

1. În silicoză experimentală — în concordanţă cu unele date din literatură — creşte concentraţia acidului palmitic atît în ţesutul pulmonar cît şi în surfactantul pulmonar.

2. În compoziţia surfactantului pulmonar intră nu numai dipalmitilfosfatidilcolină — în care caz s-ar fi găsit numai acidul palmitic — ci sînt prezente şi alte lipide cu acizii graşi diferiţi şi anume : lauric, miristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, arachidonic etc.

3. Diferenţele faţă de lotul martor nu sînt semnifictive în cazul lotului instilat cu corund şi sînt semnificative la lotul cu SiO_2, ceea ce permite să tragem concluzia că aceste modificări sînt datorate efectului specific al SiO_2 cristalin.

4. Creşterea raportului de acizi graşi saturaţi/nesaturaţi s-ar putea datora efectului lipoperoxidazic al bioxidului de siliciu asupra acizilor graşi nesaturaţi.

5. Modificările cantitative ale acizilor graşi sînt mai semnificative în primele 3 luni ale evoluţiei bolii şi mai puţin semnificative după 6 luni.

Primit la redacţie 20 aprilie 1977

Institutul de Igienă şi Sănătate Publică Laboratorul de Medicina Muncii, Cluj-Napoca

LUNG AND ALVEOLAR FATTY ACIDS IN EXPERIMENTAL SILICOSIS

(SUMMARY)

The effects of silica dust on the lipid content of lung and pulmonary alveolar lining layer (surfactant) were studied in intratracheally injected rats. The alveolar surfactant was obtained by endobronchial lavage with physiological saline. The individual fatty acids measured in the total amount as well as in isolated phospholipid components.

BIBLIOGRAFIE

1. Gh. Nadudvary, A. Coza, B. Bőhm, L. Nagy, Igiena. **XV**, 479 (1966).
2. Gh. Nadudvary, B. Böhm, Int. Arch. Gewerbepath. Gewerbehyg, **24**, 169 (1967).
3. S. E. Brown, Jour. Amer. Physiol, **207**, 402 (1964).
4. S.L. Young, D.F. Tierney, Jour. Amer. Physiol, **222**, 1539 (1972).
5. T.A. Blumenfeldt, J. M. Driscoll, L. J. Stanley, Jour. of Pediatrics, **85**, 403 (1974).
6. Sue A. Shelley, M. V. L. L'Heureux, J. U. Balis, Jour. Lipid Res, **16**, 224 (1975).
7. Y. Giudicelli, R. Pequery, M. Lacasa, Maryse Boscameric, R. Nordman, Clin. Chim. Acta, **71**, 445 (1976).
8. Silvia Gabor, T. Frits, B. Bőhm, Zoe Anca, Victoria Coldea, Elena Zugravu, Int. Arch. Arbeitsmed, **28**, 312 (1971).
9. M. Grunspan, H. Anweiler, Med. Inst. für Lufthygiene u. Silicozeforschung, Jahrberichte, 170 (1970).
10. A.G. Heppleston, K. Fletcher, I. Wyatt, Brit. Jour. Exp. Path, **55**, 384 (1974).
11. L. Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley, Jour, Biol. Chem, **226**, 497 (1957).
12. G. Rauser, S. Fleicher, Methods in Enzimology, edit. sp. Colowick **X**, 389 (1967).
13. J.J. Biezenski, W. Pomerance, J. Goodman, Jour. Chromatogr, **38**, 148 (1968).
14. L.D. Metcalfe, A.A. Schmitz, J. R. Peiza, Anal. Chem, **38**, 514 (1966).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 139—142, (1977)

DETERMINAREA SELENIULUI DIN URINĂ PRIN METODA REDIZOLVĂRII ELECTROLITICE

VICTORIA COLDEA

Rezumat. — Se descrie o metodă de derminare a seleniului din urină prin redizolvare electrolitică (stripping analysis), după o prealabilă mineralizare şi reducere a selenatului la selenit. Se prezintă de asemenea valori normale ale seleniului din urină.

Seleniu, microelement esenţial pentru desfăşurarea unor procese fiziologice la animalele cu sînge cald (1), a atras atenţia multor cercetători, care şi-au extins investigaţiile în legătură cu seleniu în diferite direcţii : cancerogeneză (2), transport de electroni (3), formare de anticorpi (4), mecanisme de îmbătrînire (5), probleme de nutriţie (6), poluare (7).

Seleniul pare să fie indispensabil procesului de creştere normal, activităţii musculare, integrităţii funcţionale hepatice şi fertilităţii (8). Importanţa cercetării lui este cu atît mai mare cu cît este cunoscut faptul că diferenţa între doza necesară şi implicit inofensivă şi doza toxică este foarte mică. Imposibilitatea tehnicilor analitice ca spectrofotometria de absorbţie de a sesiza diferenţa între nivelele necesare şi nivelele deja toxice, a dus la confuzii în anumite cercetări (9). Se impune astfel, găsirea unor metode sensibile pentru determinarea cantităţilor de seleniu în urme, în diferite materiale biologice, metode care să sesizeze aceste diferenţe, să contribuie la înţelegerea mecanismelor biochimice de acţiune a seleniului.

Metodele cunoscute care îndeplinesc aceste condiţii sînt metodele de activare cu neutroni (10), fluorometrice (11)—(16) şi polarografice (17)—(21).

Întrucît în literatura de specialitate nu este descrisă o metodă polarografică pentru determinarea seleniului din urină, am considerat necesară elaborarea unei astfel de metode.

Metoda propusă în prezenta lucrare, pentru determinarea seleniului din urină, foloseşte tehnica redizolvării electrolitice (stripping analysis) una dintre cele mai sensibile tehnici de analiză a urmelor. Dozările cantitative prin această metodă permit determinări de concentraţii de 10^{-5}—10^{-9} moli/l.

Determinările se efectuează în două etape distincte. În prima etapă substanţa electroactivă se concentrează prin depunere electrolitică pe un electrod adecvat (preelectroliza) de unde apoi în cursul celei de a doua etape se readuce în soluţie, aceasta fiind şi etapa determinării cantitative. Curba de redizolvare $I(E)$ obţinută prezintă vîrfuri a căror înălţime este proporţională cu concentraţia ionilor metalici din soluţie, iar potenţialul de semivîrf este o caracteristică a fiecărui ion. Vîrfurile de curent obţinute astfel permit determinări cantitative, selective, sensibile şi rapide.

În prezența ionilor de halogen acidul selenios formează un compus complex care este adsorbit pe suprafața electrodului cu picătura de mercur staționară (22)—(24), compus ce poate fi redus catodic după următoarea ecuație (25):

$$H_2SeCl_6 + 4\,e + Hg = HgSe + 2H^+ + 6\,Cl^-$$

Produsul de reducere obținut este HgSe, care din nou poate fi redus la potențialul de — 0,54 V. Acest vîrf se poate folosi pentru determinarea Se IV prin redizolvare catodică (cathodic stripping) utilizînd două reacții de electrod diferite și anume: pentru picul de redizolvare anodică (anodic stripping) substanța este depozitată cu agitare la + 0,05 V și după o pauză de 30 de secunde se înregistrează curba de reducere a stratului de adsorbție. Vîrful catodic se obține prin electrodizolvarea HgSe, format. Curba de redizolvare astfel obținută prezintă față de electrodul de referință două vîrfuri la — 0,7 V și — 0,54 V ce pot fi folosite pentru determinări cantitative (fig. 1). În general pentru un domeniu larg de concentrații se folosește al doilea vîrf. Ca electrolit de bază se utilizează HCl 0,2 M.

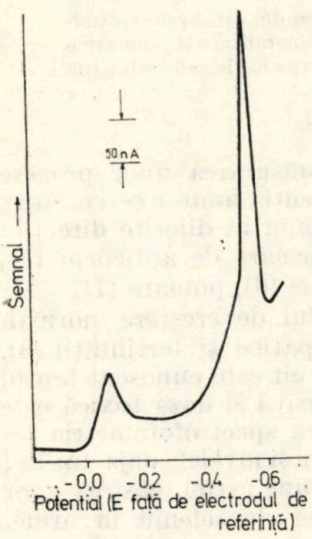


Fig. 1. — Curba de redizolvare catodică a unei soluții de 20 ppb Se în HCl 0,2 M

Aparatură:

— Polarograf LP—7 (Laboratorni pristoje Praha)

— Inregistrator EZ—7 (Laboratorni pristoje Praha)

— Echipament auxiliar pentru polarografie inversă tip E 405 (Metrohm, Elveția), cu agitator sincron, electrod de mercur cu picătura staționară și electrod de referință Ag/AgCl. Celula de electroliză este prevăzută cu pereți dubli pentru termostatare

— Tub de azot cu instalație de purificare a azotului.

Reactivi:

— Apă dublu distilată
— Acid clorhidric 37% p.a. (Merck)
— Acid azotic 65% p.a. (Merck)
— Acid percloric 70% p.a. (Merck)
— Soluție stoc: 200 μg Se/ml în HCl 0,2 M (51,290 mg K_2SeO_3 în 100 ml HCl 0,2 M)
— Soluție etalon: 0,2 μgSe/ml în HCl 0,2 M.

Parametrii aparatului:

— Electrod de mercur cu picătura staționară: 4 div./picătura
— Potențialul inițial: + 0,05 V
— Viteza de creștere a potențialului negativ: 6 mV/s.

— Direcţia de înregistrare : — ”
— Domeniul de curent : 0,5 μA la 6μA
— Durata depunerii : 2 minute cu agitare + 30 de secunde pauză (50—700 ppb) ; 3 minute cu agitare +30 secunde pauză (10—50 ppb).

METODA DE LUCRU

La 10 ml urină se adaugă 5 ml HNO_3. Digerarea are loc pînă cînd urina devine limpede, galben pai şi nu mai apar vapori bruni, La nevoie se mai adaugă HNO_3. Soluţia se răceşte, se adugă 1 ml $HClO_4$ şi se continuă încălzirea pînă la decolorare completă. După răcire se adugă 2 ml H_2O şi se fierbe pe baia de apă, pentru îndepărtarea oxidanţilor volatili, adică a Cl_2 format în timpul fierberii $HClO_4$ şi a oxizilor de azot rămaşi. Pentru reducerea selenatului la selenit se adugă 2 ml HCl 10% şi se fierbe soluţia timp de 5 minute pe baia de apă. Se completează la 12 ml cu HCl 0,2 M şi se transferă în celula de electroliză, menţinută la 25°C. La + 0,05 V are loc depozitarea seleniului cu agitare timp de două sau trei minute, în funcţie de concentraţia presupusă a fi prezentă. După o pauză de 30 de secunde se schimbă potenţialul spre valori negative şi se înregistrează curba curentului de reducere.

REZULTATE ŞI CONCLUZII

Evaluarea cantitativă se poate realiza cu ajutorul curbelor etalon obţinute prin adăugarea la urină de cantităţi cunoscute de seleniu (fig. 2), cantiatea minimă detectabilă în condiţiile descrise, fiind de 10 μg Se/1 urină.

Adăugînd la un număr de 20 de probe de urină cantităţi de seleniu cuprinse între 61 şi 64 μg/1, s-a obţinut o recuperare între 92 — 106 %.

Cu această metodă s-a urmărit concentraţia seleniului în urina a 15 subiecţi neexpuşi profesional la seleniu. Concentraţiile găsite au fost cuprinse între 10 şi 32 μg/1, media fiind 17 ± 4,58 μg/1, ceea ce corespunde cu valorile găsite în literatură (26).

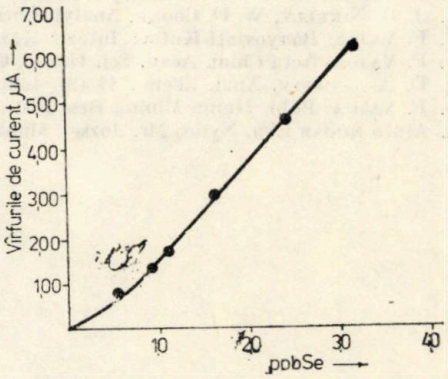


Fig. 2. — Curba de etalonare

Sensibilitatea, rapiditatea şi reproductibilitatea obţinută, pledează pentru utilizarea acestei metode la determinarea urmelor de seleniu.

Primit la redacţie
20 aprilie 1977

Institutul de Igienă şi Sănătate Publică Laboratorul de medicina muncii, Cluj-Napoca

SELENIUM DETERMINATION IN URINE BY CATHODIC STRIPPING

(SUMMARY)

A method for selenium determination in urine by cathodic stripping, after digestion and reduction of selenate to selenite, is described. The selenium normal values in urine are also presented.

BIBLIOGRAFIE

1. V. D. Frost, P. M. Lish, Annu. Rev. Pharmacol., **15**, 259 (1975).
2. R. J. Shamberger, J. Nat. Cancer Inst., **44** (4), 931 (1970).
3. T. Rotnick, W. G. Hoekstra, A. L. Pope, H. Ganther, A. Swanson, D. Hofeman, 56th Faser, abstract 2684, Atlantic City, New Jersey, April (1972).
4. T. F. Rerenshtein, Zdravookhr. Beloruss, **18** (10), 34 (1972).
5. R. A. Passwater, P. A. Welker, Amer. Lab., **3** (5), 21 (1971).
6. J. N. Thompson, M. L. Scott, J. Nutr., **97** (3), 335 (1969).
7. J. A. Raihle, Environ. Sci. Tech., **6** (7), 621 (1972).
8. H. A. Schroceder, D. V. Frost, J. J. Balassa, J. Chronic. Dis., **23** (4), 227 (1970).
9. D. V. Frost, Feedstuffs, **33**, 11 (1971).
10. A. R. Passwater, Fluorescence News, **7**, 11 (1973).
11. M. L. Cummins, J. L. Martin, G. W. Maag, D. D. Maag, Anal. Chem., **36**, 382 (1964).
12. W. B. Dye, E. Bretthauer, H. J. Seim, C. Blincoe, Anal. Chem., **35**, 1687 (1963).
13. P. Lindberg, Acta Vet. Scand. Suppl., **23**, 48 (1968).
14. F. P. Lott, Anal. Chem., **35**, 1159 (1963).
15. Milan Karvanek, Mankovska Vorlova Blanka, Sb. Vys. Sk. Chem. Technol. Praze Potraviny, E **20**, 5 (1968).
16. J. H. Watkinson, Anal. Chem., **38**, 92 (1966).
17. W. Kemula, Z. Kublik, Anal. Chim. Acta, **18**, 362 (1963).
18. R. D. De Mars S. Irving, Analyt Chem., **29**, 1825 (1957).
19. R. Moes, J. Bouch, L. Larnelle, Arch. Belg. Med. Soc. Hyg. Med. Trav. Med. Leg. **28**, 281 (1970).
20. P. Nangniot, Industrie chimique Belge, **32**, *12* (1967).
21. J. G. Nikelly, W. D. Cooke, Analyt, Chem., **29**, 933 (1957).
22. F. Vajda, Bányoszati Kutató Intézet Közlemenyei, **1**, 77 (1970).
23. F. Vajda, Acta Chim. Acad. Sci. Hung., **63**, 257 (1970).
24. D. A. Griffin, Anal. Chem., **41** (3), 462 (1969).
25. F. Vajda, Publ. Hung. Mining Res. Inst., **14**, 201 (1971).
26. Arato Sugar Eva, Nyilos Mr. Jozsef, Munkavedelem, **17**, 35 (1971).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, **20**, *2*, 143—147, (1977)

CERCETĂRI ASUPRA MECANISMULUI DE ACŢIUNE AL CUPRULUI ÎN INTOXICAŢIA SUBACUTĂ CUMULATIVĂ

ILEANA DINU, LIANA BOGHIANU

Rezumat. S-a urmărit influenţa administrării Cu^{2+}, (sub formă de SO_4Cu) în doză de 100 ppm, timp de 30 şi 60 de zile, asupra creşterii a 40 de şobolani albi şi asupra activităţii unor enzime hepatice implicate în metabolismul glucidic şi energetic. Administrarea timp de 30 de zile a Cu^{2+} a determinat scăderea eficienţei hranei şi a greutăţii corporale a şobolanilor, cît şi leziuni celulare şi biochimice la nivelul ficatului ilustrate prin inhibiţia activităţii succinat dehidrogenazei, lactat dehidrogenazei şi stimularea activităţii glucozo-6-fosfat dehidrogenazei.

După 60 de zile de administrarea Cu^{2+}, greutatea corporală nu mai diferă faţă de martor, ceea ce arată o adaptare progresivă a şobolanilor la ingesta de Cu^{2+}. Se constată însă ireversibilitatea leziunilor biochimice prin amplificarea variaţiei aceloraşi enzime.

În ultimii ani preocuparea faţă de acţiunea ionilor de cupru a crescut mult, datorită studiilor privind modificările metabolismului cuprului în diferite stări patologice (1, 2).

Datele existente în literatură permit concluzia că, deşi numeroase aspecte legate de rolul cuprului ca microelement cît şi ca element toxic nu sînt elucidate în prezent, este neîndoielnică necesitatea asigurării unui aport de cupru în alimentaţie, precum şi faptul că în anumite concentraţii care depăşesc acest necesar şi care variază de la specie la specie şi uneori chiar de la individ la individ, în cadrul aceleaşi specii, cuprul se manifestă ca un toxic protoplasmatic puternic (3).

Ţinînd seama de faptul că în ultimii ani a crescut folosirea cuprului în agricultură şi practica veterinară, cît şi în industria alimentară, de gradul de contaminare a produselor alimentare cu cupru din utilaje, rezultă că problema toxicităţii cuprului se pune cu deosebită acuitate. În ţara noastră, aportul de cupru prin hrană se situează, aşa cum arată cercetările noastre (4) la o medie de 3,7—5,4 mg pe zi, putînd ajunge în anumite condiţii chiar la 10,7—19,9 mg, adică la un aport apropiat de doza considerată toxică.

Lucrarea de faţă îşi propune să aducă o contribuţie în cunoaşterea mecanismului biochimic de acţiune a Cu^{2+}.

În acest scop s-a urmărit în dinamică influenţa Cu — sub formă de SO_4Cu — în doză de 100 ppm, asupra unor enzime din ficat implicate în metabolismul glucidic şi energetic. Alegerea dozei de 100 ppm, s-a făcut ţinînd seama de unele date din literatură, din care reiese că doze pînă la 250 ppm, nu sînt considerate toxice, în timp ce alte date aduc evidenţa unor fenomene toxice, la doze mult mai mici. Alegerea enzimelor din metabolismul glucidic s-a făcut pe baza unor cercetări proprii anterioare (5,6) care arată sensibilitatea deosebită a acestora la administrarea

metalelor. Investigarea activității enzimelor a fost făcută în ficat, cunoscut fiind rolul acestuia în metabolismul cuprului (stocare, sinteză de ceruloplasmină — forme de vehiculare a cuprului în organism — și excreția biliară a Cu).

Rezultatele cercetării de față tind să precizeze riscul pentru starea de sănătate pe care-l reprezintă contaminarea alimentelor cu cupru.

METODA

Cercetările s-au efectuat pe un număr de 40 de șobolani albi Wistar, masculi din aceeași generație, de cca 45 g, împărțiți în două serii experimentale, cîte două loturi de 10 animale în fiecare serie. În prima serie s-a urmărit timp de 30 de zile influența Cu^{2+} sub formă de So_4Cu administrat în hrană, în doză de 100 ppm, iar în a doua serie timp de 60 de zile.

În timpul experiențelor animalele au fost ținute în cuști individuale și au primit un regim semisintetic ce conținea în g la 100 g hrană : cazeină 9, amidon 69, ulei de floarea soarelui 12, amestec de săruri Osborne-Mendel 4, drojdie de bere uscată 4, substanță de balast 2. În reducerea aportului proteic și creșterea aportului lipidic al regimului s-a ținut seama de faptul că în această condiție se mărește sensibilitatea testului toxicologic.

Săptămînal s-a admimstrat per os, fiecărui animal : Vitamina A—270 U.I., vitamina E—1 mg și vitamina D_2—100 U.I.

Proba de creștere s-a efectuat timp de 30 și 60 de zile, urmărindu-se în acest interval cîștigul săptămînal în greutate, greutatea finală a animalelor, ingesta și eficiența hranei (cîștigul în greutate/g de hrană ingerată).

La sfîrșitul experiențelor (perioadei de intoxicare) animalele au fost sacrificate și s-a prelevat ficatul care a fost omogenizat la cca 2°C în medii de extracție și diluții diferite.

În omogenatele de ficat s-au determinat activitățile următoarelor enzime : activitatea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G6PDH), determinată după metoda indicată de C.W. Löhr (7) iar rezultatele exprimate în unități Wroblevsky ; activitatea glucozo 6-fosfatazei (G6P), determinată după metoda indicată de A. E. Harper (8) și exprimată în μM fosfat/g ficat/minut ; activitatea aldolazei determinată după metoda lui W.U. Bergmeyer (9), rezultatele exprimîndu-se în μM Fru—1, 6—P_2/g ficat/h, iar a lactatdehidrogenazei (LDH) prin metoda G. Weber (10) exprimată în μM piruvat/g ficat/h ; activitatea succinat dehidrogenazei (SD) determinată după metoda Kun (11) rezultatele exprimîndu-se în gama formazan/mg ficat/15', iar a succinat oxidazei (SO) prin metoda manometrică condițională Warburg, rezultatele exprimîndu-se în μl/O_2/50 mg ficat/h.

Rezultatele obținute au fost prelucrate statistic, indicînd gradul de semnificație cu o probabilitate de 99,95 și 99,99%.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Administrarea repetată a sulfatului de cupru, în doză de 100 ppm, unui lot de șobolani masculi, timp de 30 de zile, a influențat creșterea șobolanilor, greutatea finală a lotului experimental fiind semnificativ scăzută față de cea a lotului martor. Această scădere a greutății se datorește unei eficiențe scăzute a hranei la lotul intoxicat, față de lotul martor (tabel 1 a.).

Fenomenul constatat de noi este contrar datelor care arată stimularea creșterii porcilor, produsă cu doze de 100 ppm Cu^{2+} în crescătoriile din Anglia, ceea ce demonstrează diferențele între specii în metabolismul cuprului.

Urmărind în continuare creșterea șobolanilor, se constată că după 60 de zile de administrare cu Cu^{2+}, în doză de 100 ppm, greutatea corporală a animalelor și eficiența hranei nu mai prezintă modificări semnificative

statistic, deși greutatea finală se menține cu 10% mai scăzută față de martor (tabel 1 b).

Recuperarea greutății corporale, arată o adaptare progresivă a șobolanilor la administrarea cuprului, deci o regresiune a fenomenelor toxice globale.

Tabela 1

Influența administrării Cu^{2+}, în doză de 100 ppm, timp de 30 și 60 de zile, asupra creșterii șobolanului alb.

a/ Loturile	30 ZILE								
	Greutatea corporală finală			Ingesta medie pe zi			Eficiența hranei		
	Medie	ES	P	Medie	ES	P	Media	ES	P
I — Martor	170,5	4,7		15,4	0,32		0,27	0,010	
II — Cu 100ppm	150,1	9,0	<0,05	15,3	0,49	>0,05	0,22	0,015	<0,005
b/	60 ZILE								
I — Martor	232,0	11,8		15,9	0,56		0,19	0,007	
II — Cu 100 ppm	209,95	9,4	>0,05	16,0	0,39	>0,05	0,17	0,009	>0,05

Cuprul — sub formă de sulfat de cupru — administrat timp de 30 de zile, în doză de 100 ppm, a determinat modificarea activității unora din enzimele hepatice investigate (tabel 2 a). Astfel se constată o scădere a activității succinat dehidrogenazei, care însă nu influențează sistemul succinat oxidazei, consumul de O_2 nefiind semnificativ modificat.

Din enzimele investigate implicate în metabolismul glucidelor, glucozo-6-fosfataza și aldolaza nu au prezentat modificări în timp ce glucozo-6-fosfat dehidrogenaza a prezentat o creștere importantă a activității (50%).

Rezultatele obținute arată că în intoxicarea cronică — cumulativă — cu Cu^{2+}, mecanismul de acțiune al acestuia diferă de cel din intoxicația acută, în care se consideră că anemia hemolitică produsă de dozele mari de cupru, se datorește unei inhibiții a G6PDH (2).

Stimularea activității G6PDH obținută de noi s-ar putea interpreta ca o stimulare inițială a activității șuntului pentozo-fosforic, necesară în condiția stress-ului chimic produs de administrarea Cu^{2+}.

Activitatea lactat dehidrogenazei a prezentat după 30 de zile de administrare a cuprului, o scădere semnificativă statistic a activității de 27% față de martor. Această scădere ar putea fi explicată fie printr-o inhibiție parțială exercitată de Cu^{2+} asupra enzimei, fie prin modificări de permeabilitate ale membranei, ceea ce ar putea duce la o eliberare a enzimei din celula hepatică.

Urmărind activitatea acelorași enzime, după 60 de zile de administrare a Cu^{2+}, se constată menținerea modificărilor înregistrate după 30 de zile, cu o amplificare a fenomenului în unele cazuri (tabel ab). Astfel activitatea SD prezintă o inhibiție ceva mai accentuată, iar G6PDH o stimulare a activității de 99% față de martor. Inhibiția activității LDH,

constatată inițial, se menține de asemenea după 60 de zile de administrare a cuprului.

Pe baza rezultatelor obținute se poate considera, că doza de 100 ppm Cu^{2+}, depășește capacitatea de detoxifiere a ficatului, determinînd leziuni biochimice la nivelul hepatocitului. Astfel unele date din literatură (1,2) arată că dozele mari de cupru care nu mai pot fi exercitate prin bilă, se depun în fracția celulară solubilă hepatică, unde au loc reacții de combinare a cuprului cu grupele tiolice mitocondriale, ceea ce duce la umflarea și liza mitocondriilor hepatice. Aceste reacții provoacă de asemenea modificarea structurii terțiare și quaternare din membrana mitocondrială, determinînd astfel modificări mari de permeabilitate.

Modificările activităților enzimatice constatate în lucrarea de față, se bazează probabil pe mecanisme asemănătoare și inhibiții enzimatice exercitate de Cu^{2+}.

CONCLUZII

1. — Administrarea repetată timp de 30 de zile a Cu^{2+} în doză de 100 ppm a produs efecte toxice evidente, prin modificarea eficienței hranei și a greutății corporale a șobolanilor din lotul experimental.

2. — După 60 de zile de administrare a Cu^{2+}, în doza de 100 ppm greutatea corporală a animalelor și eficiența hranei nu mai prezintă modificări față de martor, ceea ce arată o adaptare progresivă a șobolanilor la ingesta de cupru.

3. — Administrarea Cu^{2+} timp de 30 de zile a determinat modificări enzimatice ilustrate prin inhibiția activității SD și LDH și stimularea activității G6PDH, variații ce pun în evidență leziuni biochimice și celulare la nivelul ficatului.

4. — Activitatea acelorași enzime, după 60 de zile de administrarea cuprului, arată ireversibilitatea leziunilor biochimice și celulare cu amplificarea fenomenului în cazul inhibiției activității SD și a stimulării activității G6PDH.

5. — Se consideră că doza de 100 ppm Cu^{2+}, deși este în limitele care permit o adaptare progresivă a șobolanilor, prin recuperarea greutății corporale în timp, depășește capacitatea de detoxifiere a ficatului, determinînd leziuni biochimice ireversibile la nivelul hepatocitului.

Prezentat la redacție
5 oct. 1976

Institutul de higienă și sănătate publică
București

INVESTIGATIONS ON THE ACTION MECHANISM OF COPPER IN SUBACUTE CUMULATIVE INTOXICATION

(SUMMARY)

The influence of Cu^{2+} administration (as So_4Cu) in 100 ppm dose was followed for 30 and 60 days on the growth of 40 white rats and on the activity of some hepatic enzymes implied in the carbohydrated and energetic metabolism.

The 30 days administration of Cu^{2+} led to the decrease of food efficiency and of the body weight of rats, as well as to cell and biochemical lesions at the liver level, pointed out by the inhibition of succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and stimulation of the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. 60 days after the Cu^{2+} administration, the body weight differs no more versus the control, fact which shows a gradual adjustment of rats to the Cu^{2+} ingestion. But the irreversibility of biochemical lesions is noticed by the amplification of the variation of the same enzymes.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Abrarov, Vopr. Pitania, *5*, 31 (1961).
2. J. C. Peden, Nutr. Rev., **25**, *11*, 321 (1967).
3. M. M. Allen, The Veter. Rec., *6*, 74 (1962).
4. R. Rautu, A. Sporn, Igiena, *7*, 401 (1967).
5. I. Dinu, L. Boghianu, E. Botescu, A. Sporn, Igiena, 8 (1972).
6. I. Dinu, L. Bogianu, Rev. Roum. Biochim., **10**, *2*, 105–111 (1973).
7. C. W. Löhr, H. D. Waller, În *Methods of Enzymatic Analysis*, Edited by H. U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, 1963, p. 744.
8. A. E. Harper, în *Methods of Enzymatic Analysis* Edited by H. U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, 1963, p. 788.
9. H. F. Bruns, H. U. Bergmeyer, în *Methods of Enzymatic Analysis*, Edited by H. U. Bergmeyer, Acad. Press, New York, 1963, p. 724.
10. G. Weber, J. Nutr., *71*, 156 (1960).
11. S. Kun, L. G. Abood, Science, *109*, 144 (1949).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 149—154 (1977)

CARACTERIZAREA ULTRASTRUCTURALĂ ŞI BIOCHIMICĂ A GONADELOR UNOR SPECII DE PEŞTI ÎN DIFERITE STADII DE DEZVOLTARE. IV. COMPORTAREA LA GEL-FILTRARE A PROTEINELOR ACVOSOLUBILE

OFELIA GOZIA, M. ŞERBAN, DOINA POPOV

Rezumat. Numărul fracţiunilor proteice separate prin gel-filtrare, greutăţile lor moleculare şi eterogeneitatea electroforetică a acestora variază în funcţie de specie (morun, cegă, păstrugă, nisetru), organele sexuale analizate (testicole, ovare) şi stadiul de maturare al acestora (previtelogeneză, vitelogeneză, maturarea gameţilor, faza după reproducere). După reproducere, în testicolele de cegă are loc formarea unor agregate proteice, iar în oocitele rămase nefecundate scindări de complexe proteice. Oocitele tinere de nisetru relevă o variabilitate în timp a spectrelor electroforetice datorată procéselor intense de diferenţiere care au loc în stadiile tinere de dezvoltare a elementelor sexuale.

Studiul polimorfismului proteinelor unor populaţii de peşti a contribuit, în ultimul timp, la reviziuirea unor concepţii privind factorii de evoluţie şi structură genetică a populaţiilor respective (1).

Într-o lucrare anterioară (2), s-au caracterizat proteinele gonadelor unor specii de peşti *Chondrostei* atît din punct de vedere al eterogenităţii electroforetice, cît şi al comportării lor în prezenţa unor agenţi denaturanţi (temperatură, uree, tripsină). S-a constatat astfel, că eterogenitatea electroforetică a proteinelor acestor gonade prezintă anumite particularităţi în funcţie de specie şi sex.

În continuarea acestor cercetări, în această lucrare ne-am propus urmărirea comportării la gel-filtrare a proteinelor acvosolubile obţinute în diferite etape de maturare şi diferenţiere a elementelor sexuale (ovare şi testicole) ale unor specii de peşti *Chondrostei*. Obiectivul acestor cercetări urmăreşte o cunoaştere mai profundă a proceselor biochimice ale diferenţierii celulare, aspect care poate prezenta interes practic pentru problemele de reproducţie artificială a peştilor.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat pe porţiuni de gonade prelevate din ovarele şi testicolele a 4 specii de peşti din familia *Acipenseridae*, şi anume: *Huso huso* (morun), *Acipenseri ruthenus* L (cegă) *Acipenser stellatus* Palas (păstrugă), *Acipenser guldenstaedti* Brandt (nisetru).

Proteinele acvosolubile din ovare (stadii tinere), ocite (stadii de dezvoltare avansată care au permis separarea lor din stroma ovarului) şi testicole în diferite stadii de maturare, au fost extrase şi prelucrate după metoda descrisă anterior, (2).

Gel-filtrarea preparatelor proteice s-a efectuat la + 20°C în tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,5, utilizînd o coloană de Sephadex C—200 (1,5 × 68 cm). S-au aplicat probe de 1—2,25

ml — conţinînd între 11,2—24,6 mg proteină/ml. Au fost colectate fracţiuni de cîte 3 ml, iar concentraţiile proteice s-au determinat pe baza măsurării DO la 280 nm.

Separarea electroforetică a proteinelor s-a efectuat în gel de agaroză 1% în tampon acid barbituric-barbiturat de sodiu, pH 8,7, în condiţiile descrise anterior(2).

Greutăţile moleculare ale piscurilor proteice separate prin gel-filtrare au fost determinate conform metodei preconizate de Andrews (3); pentru etalonarea coloanei de Sephadex G—200 s-au utilizat următorii martori: citocrom (greutate moleculară 12 270), RN-ază (13 680), pepsină (35 000), fosfatază alcalină (140 000), Blue dextran (2000000) (fig. 1).

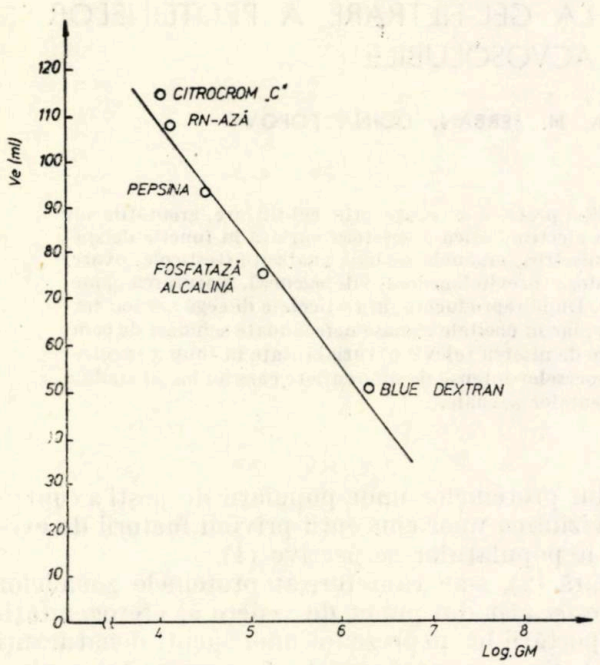


Fig. 1. — Curba etalon pentru determinarea greutăţilor moleculare.

Extincţia Blue dextranului şi a citocromului c s-au determinat spectrofotometric la $\lambda = 260$ nm şi respectiv la $\lambda = 410$ nm (4). Activitatea fosfatazei alcaline, RN-azei şi pepsinei au fost determinate prin metodele utilizate curent (5) (6) (7).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din datele obţinute reiese că numărul fracţiunilor proteice separate prin gel-filtrare, greutăţile lor moleculare şi polimorfismul electroforetic al acestora variază în funcţie de specie, elementul sexual analizat şi etapa de dezvoltare a acestora. La toate variantele analizate, spectrul electroforetic al piscurilor proteice separate prin gel-filtrare relevă numai fracţiuni electronegative. Astfel, proteinele acvosolubile extrase din testiculele tinere de morun evidenţiază la gel-filtrare (fig. 2 *a*) un singur pisc proteic corespunzător unei greutăţi moleculare la aproximativ 290 000. Analiza electroforetică a acestui pisc indică prezenţa a 4 fracţiuni; fracţiunea proteică cea mai puţin electronegativă este sub raport cantitativ cea mai evidentă datorită, probabil, asocierii ei cu componente glucidice şi lipidice (2).

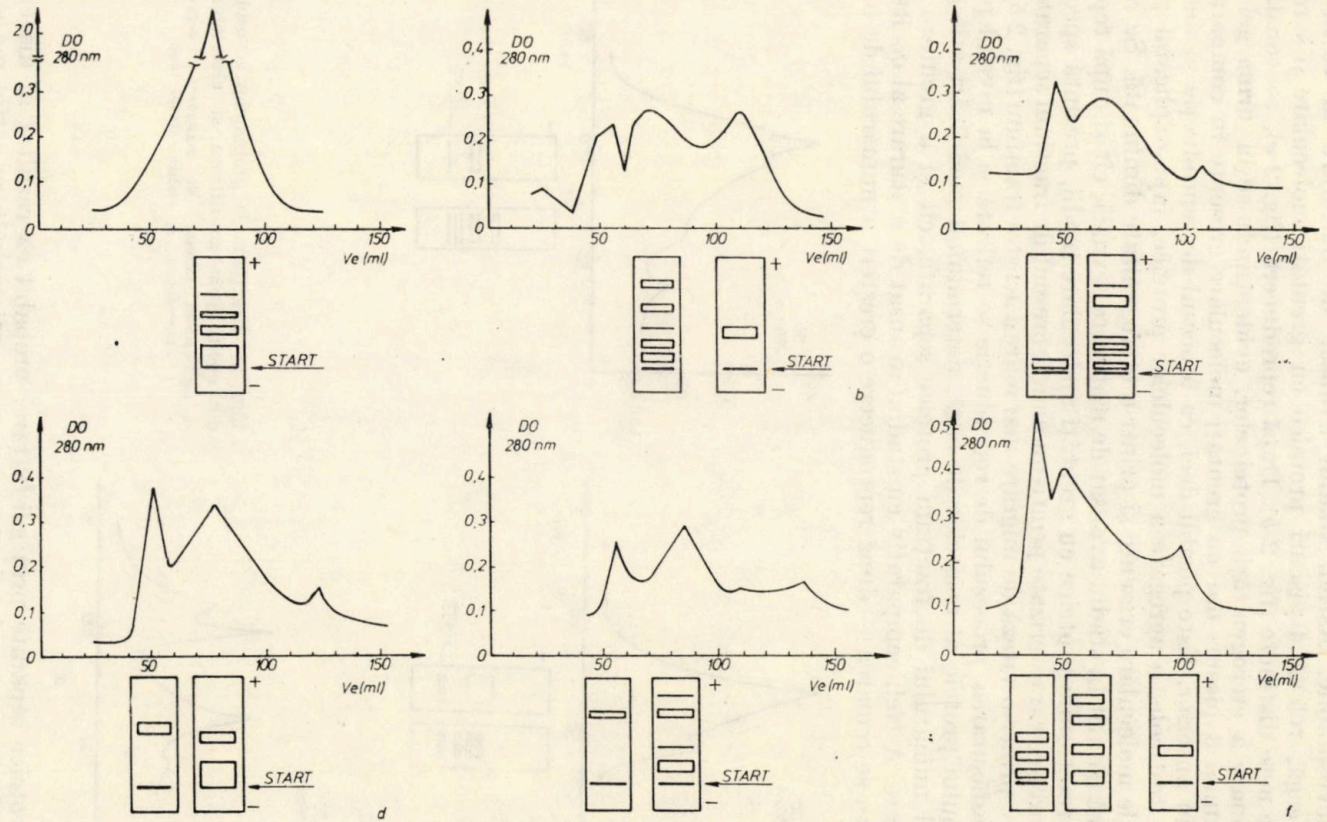


Fig. 2 — Fracţionarea proteinelor acvosolubile din testicole prin gel-filtrare şi electroforeză.

a) morun – stadiu tînăr; *b*) cegă – stadiu avansat de maturare; c) cegă – după reproducere; d) păstrugă – stadiu avansat de maturare; e) păstrugă – stadiu intermediar; f) nisetru – stadiu tînăr; M) greutatea moleculară.

Modificările de ordin biochimic şi fiziologic care însoţesc procesul de maturare şi reproducere la cegă, sînt sugestiv reflectate la nivelul proteinelor acvosolubile. Astfel, stadiul avansat de maturare al testicolelor de cegă, relevă 4 piscuri proteice cu greutăţi moleculare şi sarcini electrice nete distincte (fig. 2 *b*). După reproducere (fig. 2 *c*), se constată o diminuare a eterogenităţii proteinelor, evidenţiindu-se în urma gel-filtrării numai 3 piscuri dar cu greutăţi moleculare crescute în comparaţie cu stadiu anterior. Este posibil deci, ca procesul de reproducţie să determine în testicole, o agregare a moleculelor proteice, fapt explicabil prin greutăţile moleculare crescute şi printr-o eterogenitate diminuată. Se constată însă că atît în stadiu avansat de maturare sexuală, cît şi după reproducere, fracţiunile proteice cu greutăţi moleculare medii, prezintă spectre electroforetice caracterizate printr-un număr crescut de fracţiuni separate şi respectiv printr-o viteză de migrare mai mare a acestor fracţiuni (fig. 2 *b*, *c*).

Desfăşurarea procesului de reproducţie se reflectă şi la nivelul polimorfismului proteic al oocitelor de cegă, determinînd modificări atît sub raportul numărului de fracţiuni proteice separate, cît şi a greutăţii lor moleculare. Astfel, comparativ cu stadiul avansat de maturare al oocitelor (fig. 3 *a*), se remarcă — după reproducere o creştere a numărului de frac-

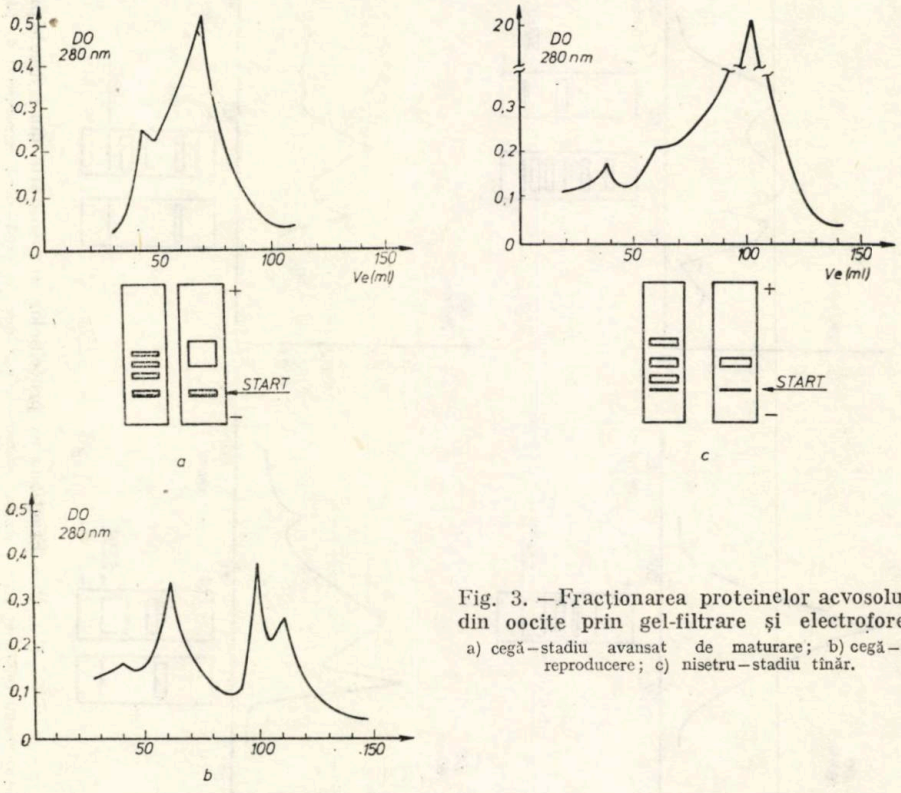


Fig. 3. — Fracţionarea proteinelor acvosolubile din oocite prin gel-filtrare şi electroforeză.
a) cegă — stadiu avansat de maturare; b) cegă — după reproducere; c) nisetru — stadiu tînăr.

ţiuni proteice separate prin gel-filtrare, probabil ca rezultat al disocierii sau scindării unor molecule proteice mari, micşorîndu-se astfel masa lor moleculară. În acest sens, pledează şi faptul că cercetări anterioare (2)

au pus în evidență după reproducerea oocitelor de cegă, o scindare a benzii electroforetice 4 în două fracțiuni. Același fenomen se constată și în urma fracționării proteinelor prin gel-filtrare (fig. 3 *a*, *b*). Rezultatele menționate atestă că în oocitele de cegă rămase nefecundate se petrec modificări la nivelul complexelor proteice, care afectează atît greutățile lor moleculare cît și sarcinile electrice nete. Modificări ale eterogenității proteinelor în diferite etape de dezvoltare a oocitelor au fost semnalae și de alți autori (8).

Analiza proteinelor acvosolubile din testicolele de păstrugă în stadiile intermediare și avansate de dezvoltare (fig. 2 *d*, *e*), relevă comportări similare la gel-filtrare ; aceste proteine se separă în trei piscuri proteice cu greutăți moleculare asemănătoare, cuprinse între 160 000 și 1 800. Atît în stadiul intermediar cît și în cel avansat de dezvoltare, fracțiunea proteică cu greutate moleculară medie prezintă spectrul electroforetic cel mai variat atît sub raportul numărului de benzi electroforetice, cît și al vitezei de migrare.

Gel-filtrarea și analiza electroforetică (efectuată anterior) (2) a proteinelor din testicolele tinere de nisetru indică prezența a trei fracțiuni (fig. 2 *f*) ; primele două piscuri de greutăți moleculare mari, au prezentat la electroforeză o eterogenitate crescută.

Proteinele din oocitele tinere de nisetru se separă prin gel-filtrare în trei fracțiuni cu greutăți moleculare variabile (fig. 3 *c*). În acest caz se remarcă o variabilitate în timp a spectrelor electroforetice ale celor trei fracțiuni evidențiată prin dispariția unor fracții. Această modificare se corelează cu o mai mică rezistență a proteinelor față de acțiunea unor agenți denaturanți ca temperatură, uree și tripsină, constatată de noi anterior la oocitele de nisetru (2). Este posibil ca aceste particularități ale proteinelor oocitelor de nisetru să fie datorate stadiilor tinere de diferențiere a elementelor sexuale.

Separarea proteinelor prin gel-filtrare într-un număr variabil de fracțiuni (în marea lor majoritate eterogene din punct de vedere electroforetic) în funcție de genul, specia, stadiul de maturare a gonadelor urmărite, permit avansarea ipotezei asupra existenței unei specificități în raport cu fiecare din factorii menționați mai sus.

În cercetările efectuate de Perrier și colab. (9), (10), deși nu au evidențiat existența unor similitudini între speciile aparținînd unei aceleiași familii, se menționează o clasificare a proteinelor plasmatice la păstrăvi pe baza rezultatelor fracționării prin gel-filtrare, disc-electroforeză și precipitării cu sulfat de amoniu.

Specificitatea remarcată de noi în cazul gonadelor diferitelor specii de pești *Chondrostei* poate fi corelată cu funcțiile pe care proteinele le îndeplinesc în celulă în diferite etape de maturare a elementelor sexuale studiate.

Studierea aspectelor biochimice legate de maturarea gonadelor și reproducerea diferitelor specii de pești poate aduce alături de cercetări de embriogeneză contribuții la cunoașterea și fundamentarea reproducerii artificiale, în scopul sporirii rolului acesteia în economia piscicolă (11).

CONCLUZII

1. Caracterizarea prin gel-filtrare a proteinelor acvosolubile ale unor specii de pești *Chondrostei* a relevat existența unei specificități de specie, organ și stadiul de maturare sexuală.

2. La testicolele de cegă, se remarcă, după reproducere, formarea unor complexe proteice, în timp ce în oocitele rămase nefecundate au loc procese intense de scindare a agregatelor proteice.

3. În cazul testicolelor de păstrugă, gel-filtrarea a permis relevarea existenței unei similitudini între cele două stadii de maturare urmărite, atît sub aspectul eterogenității fracțiunilor separate, cît și a greutății lor moleculare.

4. Procesele intense de diferențiere care se petrec în stadiul tînăr de dezvoltare a oocitelor de nisetru, sînt reflectate de variabilitatea în timp a spectrelor electroforetice.

Prezentat la redacție
la 4 aprilie 1977

Institutul de Științe Biologice,
Colectivul de Enzimologie
* *Institutul Agronomic „N. Bălcescu”,*
Catedra de Chimie, București

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF GONADS FROM SEVERAL FISH SPECIES IN DIFFERENT DEVELOPMENTAL STAGES. IV. GEL-FILTRATION BEHAVIOUR OF WATER-SOLUBLE PROTEINS

(SUMMARY)

The number of protein peaks fractionated by Sephadex G—200 gel-filtration, their molecular weight and electrophoretic heterogeneity are rather typical properties depending on the investigated species (great sturgeon, sterlet, stor sturgeon and common sturgeon), gonads (testis, ovaries) and maturation stage (previtelogenesis, vitelogenesis, developed and after reproduction). Several protein agregates are built up in sterlet testis after fertilization. However, some breakdowns of protein complexes occurred in nonfertilized oocytes. Juvenile common sturgeon oocytes show a time dependent variability of electrophoretic patterns due to the high active differentiation phenomena occurring in the early developmental stages of sexual elements.

BIBLIOGRAFIE

1. J. H. Shröder, *Genetics and mutagenesis of fisch*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, p. 233 (1973).
2. Maria Caloianu-Iordăchel, Doina Popov, Ofelia, Gozia, M. Șerban, Rev. roum Biochim., **13**, *185* (1976).
3. P. Andrews, Biochem. J., **96**, *595* (1965).
4. M. J. Arslanian, E. Pascoe, J. G. Reinhold, Biochem. J., **125**, 1039 (1971).
5. L. Engström, Biochem. Biophys. Acta, **52**, *36* (1961).
6. F. Egami, K. Takahashi, T. Uchida, în *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, ed. J. N. Davidson, W. E. Colen, **3**, *59* (1964).
7. M. Anson, J. Gen. Physiol., **22**, *79* (1938).
8. N. I. Kulikova, Biochim. Evol., ed. E. M. Kreps „Nauka”, Leningrad, Otd. Leningrad, URSS, p. 101 (1973).
9. H. Perrier, J. P. Delacroix, C. Perrier, J. Gros, Comp. Biochem. Physiol., **46B**, *457* (1973).
10. H. Perrier, J. P. Delacroix, C. Perrier, J. Gros, Comp. Biochem. Physiol., **49B**, *679* (1974).
11. Aurelia Nicolau, Gh. Brezeanu, Maria Caloianu-Iordăchel, A. Bușniță, *Reproducerea artificială și dezvoltarea la pești*, Ed. Acad. R.S. România, *225*(1973).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 155—158, (1977)

COMPOZIŢIA ÎN NUCLEOTIDE A RNA-RIBOZOMAL DIN *A.NIGER*

MAGDALENA LUNGU, S. VASU

Rezumat. r-RNA din *A. niger* rezultaţi în urma extracţiei acizilor nuclici cu acetat de p otasiu 3 M, au fost supuşi hidrolizei alcaline şi analizei cromatografice pe Dowex 2X8 în gradient discontinuu de acid formic (0,1M—1 M). Fracţiunile astfel obţinute au fost analizate spectrofotometric şi prin cromatografie în strat subţire. Cromatografia pe Dowex 2XB permite separarea CMP şi AMP şi nu rezolvă GMP şi UMP din hidrolizatul alcalin. Totodată, alături de aceste nucleotide se obţine o fracţie în cantitate mică, diferită de nucleotidele menţionate. Cromatografia în strat subţire separă UMP şi GMP cu cei 2 izomeri ai lui. Izomerii 3'(2') ai nucleotidelor standard au putut fi separaţi în cazul CMP şi GMP dar nu şi al AMP şi UMP.

Cercetarea acizilor nucleici din *A. niger* şi a enzimelor implicate în metabolismul acestora (1) (2) (3) (4) necesită caracterizarea diferiţilor produşi prin compoziţia lor în baze şi nucleotide purinice şi pirimidinice.*

În prezenta lucrare ne-am propus să urmărim compoziţia în nucleotide a r-RNA din *A. niger* obţinuţi în urma extracţiei cu acetat de potasiu 3M (6) supuşi hidrolizei alcaline (7) folosind cromatografia pe coloană de Dowex 2X 8 (8) şi cromatografia în strat subţire (9) (10).

MATERIAL ŞI METODE

A. niger ICA-34 (din colecţia ICICA-Bucureşti) a fost cultivat pe mediu Raulin, în culturi de suprafaţă (10). Miceliul în vîrstă de 3—4 zile a fost prelucrat pentru extracţia şi purificarea acizilor nucleici, cu fenol 8-hidroxichinolină în prezenţă de bentonită şi sodiu dodecisulfat, după cum au arătat anterior (1) (2), iar r-RNA au fost obţinuţi în urma extracţiilor repetate cu acetat de potasiu 3M (5).

Electroforeza r-RNA în gel de poliacrilamidă-agaroză s-a realizat în condiţiile descrise de Vasu şi Hulea (3).

r-RNA a fost hidrolizat cu hidroxid de potasiu 0,3N timp de 18 ore la 36°C; după neutralizare cu acid percloric, la rece, percloratul de potasiu s-a îndepărtat prin centrifugare (6).

Hidrolizatul de r-RNA a fost supus cromatografiei pe Dowex 2X8 în gradient discontinuu de acid formic (0,1M şi 1M) (7).

Fracţiunile separate cromatografic au fost analizate spectrofotometric în ultraviolet la 250, 260, 280 nm (11) şi prin cromatografie în strat subţire.

Cromatografia în strat subţire s-a realizat pe folii de plastic cu faza staţionară celuloză MN300 F_{254} (Merck) şi faza mobilă sulfat de amoniu (saturat) — acetat de sodiu (1M) — izopropanol (80 :18 :2) şi acid izobutiric-hidroxid de amoniu (10N)—apă (66 :1 :33) după indicaţiile date de Randerath (8) (9).

---

* Abrevieri : DNA — acid dezoxiribonucleic ; r-RNA — acid ribonucleic ribozomal ; t-RNA — acid ribonucleic de transfer, CMP — acid citidilic ; AMP — acid adenilic ; GMP — acid guanilic ; UMP — acid uridilic.

Fracțiunile astfel separate s-au evidențiat prin fluorescență în ultraviolet la Uvifot, folosind filtru 254 nm.

Ca substanțe standard s-au utilizat : AMP—3'(2') ; CMP—3'(2') ; GMP—3(2') ; UMP—3'(2') ; de proveniență Calbiochem.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Preparatul de r-RNA din *A. niger* evidențiază electroforetic patru fracții, dintre care primele două corespund probabil la r-RNA 28S și r-RNA 18S, (fig. 1).

Nu indică prezența DNA și numai în foarte mică măsură t-RNA ; aceste specii s-au îndepărtat prin tratare cu acetat de potasiu 3M (5).

Hidroliza alcalină a r-RNA determină eliberarea unui amestec de nucleotide care prin cromatografie pe Dowex 2X8 în gradient discontinuu de acid formic, duce la separarea a patru fracții (fig. 2 a)

Un amestec de CMP, AMP, GMP, UMP (standard 1 mg/ml) supus cromatografiei pe Dowex 2X8, determină separarea a patru fracții majore (fig. 2b).

Analiza spectrofotometrică a fracțiunilor obținute în cromatografierea r-RNA, după indicațiile date de Chargaff și Davidson (11) arată că rapoartele calculate pentru fracțiile I și II corespund CMP și respectiv AMP (tabela 1), rapoartele calculate pentru fracția IV s-ar putea să corespundă unui amestec de GMP și UMP. Rapoartele pentru fracția III nu se aseamănă cu nici unul din rapoartele ce caracterizează nucleotidele majore din structura r-RNA.

Tabela 1

Valorile DO la diferite lungimi de undă corespunzătoare fracțiunilor din fig. 2a,

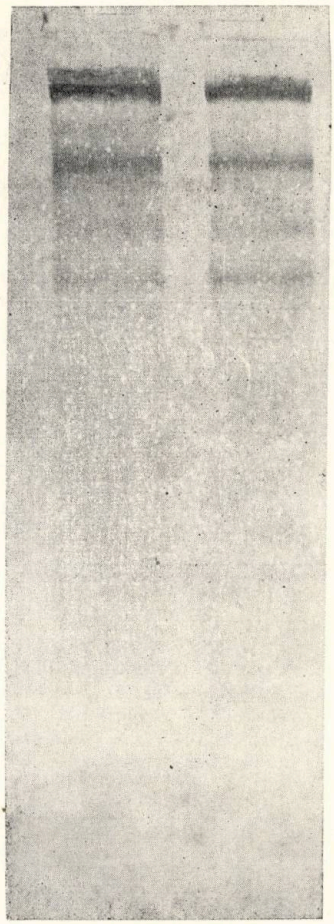
Nr. fracție	DO			250/260	280/260	Nucleotide	după Chargaff (11)	
	250 nm	260 nm	280 nm				250/260	280/260
I	3,3	6,7	12,6	0,49	1,8	CMP	0,45	2
II	13,8	1,6	4,2	0,86	0,26	AMP	0,85	0,23
III	0,94	0,78	0,4	1,2	0,23	GMP	0 ,90	0,68
IV	1,8	1,7	0,4	1,9	0,23	UMP	0,76	p,32

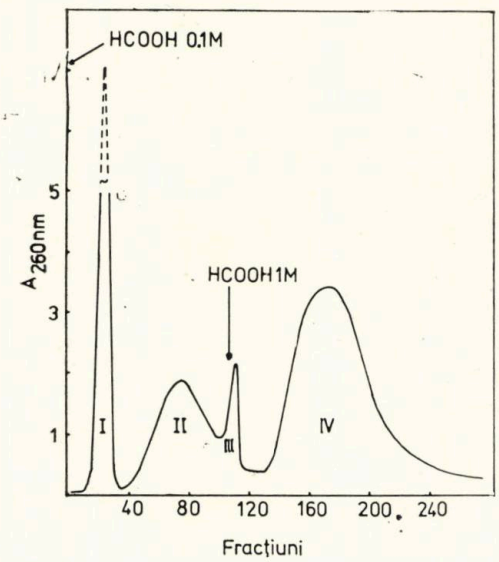
Cromatografia în strat subțire a fracțiilor eluate de pe Dowex 2X8 a evidențiat următoarele : (fig. 3 *a*) fracția I conține CMP, fracția II conține AMP, fracția IV corespunde la 2 izomeri ai GMP și UMP, iar fracția III care indică un singur spot nu se identifică cu nici unul din nucleotidele standard folosite. Compoziția în nucleotide a fracției IV am confirmat-o și prin utilizarea unui alt sistem de migrare (9) care permite o mai bună separare a UMP față de CMP și GMP (fig. 3 *b*).

Supunînd cromatografiei în strat subțire nucleotidele standard separate pe coloană de Dowex 2X8 (fig. 4) s-au identificat CMP și GMP cu cei 2 izomeri ai lor și AMP și UMP.

Luînd în considerare fracția IV în care au fost eluate împreună GMP și UMP, pentru a determina proporția fiecăruia, am recurs la raportul dintre GMP și UMP stabilit de Moyer și Storck (12), la valorile coefi-

Fig. 1. — Electroforegrama în gel de poliacrilamidă-agaroză a r-RNa din A. niger.





b

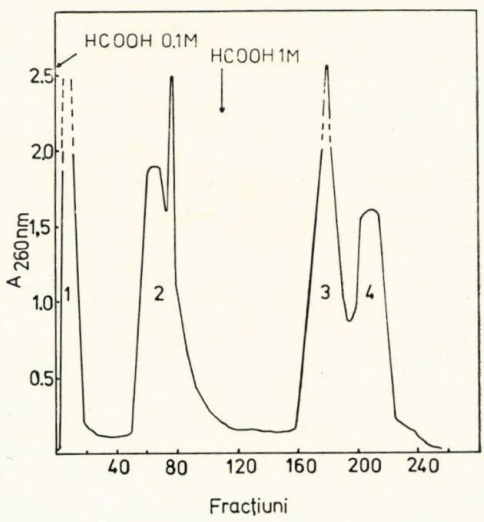


Fig. 2. — Cromatograma pe coloană de Dowex 2X8 în gradient de acid formic (a. Hidrolizatul alcalin al r-RNA din A. niger; b. Amestec de nucleotide standard).

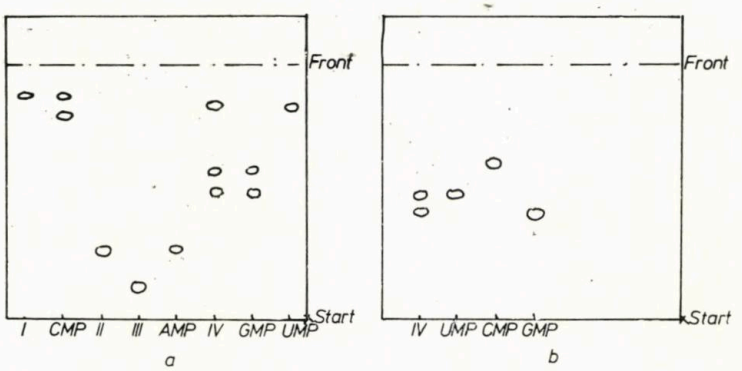


Fig. 3. — Cromatografia în strat subțire a fracțiilor obținute pe coloană de Dowex 2X8 a hidrolizatului alcalin și a nucleotidelor standard. (a. Placa a fost developată în sistemul : sulfat de amoniu (saturat) — acetat de sodiu 1 M — izopropanol ; 80 :18 :2(8) b. Placa a fost developată în sistemul : acid izobutiric — hidroxid de amoniu 10N — apă ; 66 :1 :33(9) ; — nucleotidele standard — 1 mg/ml în hidroxid de amoniu 0,1N).

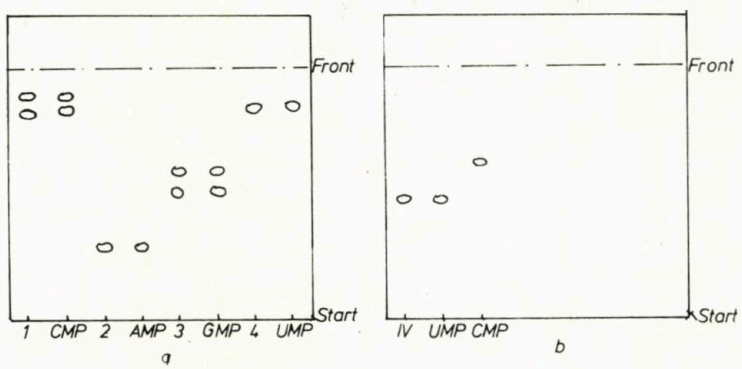


Fig. 4. — Cromatografia în strat subțire a fracțiilor obținute pe coloana de Dowex 2X8 — amestec de nucleotide standard și a nucleotidelor standard. (a. Placa a fost developată în sistemul : sulfat de amoniu (saturat) — acetat de sodiu 1M — izopropanol ; 80 : 18 : 2(8) b. Placa a fost developată în sistemul : acid izobutiric — hidroxid de amoniu 10N — apă ; 66 :1 : 33(9) ; — nucleotidele standard — 1 mg/ml în hidroxid de amoniu 0,1N .

cienților de extincție molară și la valorile DO la 260 nm a fracției IV. Considerînd raportul dintre GMP și UMP ca fiind 30/23 și notînd cu x și y concentrațiile lui GMP și UMP pe care dorim să le determinăm din rezolvarea ecuației: $E_{x+y} = \varepsilon_{260_x} x + \varepsilon_{260_y} y$ obținem procentele de GMP și UMP (26 și 20%).

Ținînd cont de valorile DO la 260 nm obținute pentru fracțiunile I și II și de valorile coeficienților de extincție molară, am calculat procentele pentru CMP și AMP (24,5 și 25,3%). Practic, se obțin în felul acesta proporții de nucleotide similare celor găsite de alți autori (13) (12) prin metode diferite de cele folosite de noi. Cifrele noastre sînt întrucîtva diferite față de cele date de Moyer și Storck (12) deoarece produsul analizat de noi este constituit din acizii nucleici extrași cu acetat de potasiu 3M (5) deci conține atît r-RNA citoplasmatici cît și mitocondriali care, după cum a arătat Edelman și col. (14) diferă între ei prin proporția de nucleotide.

Din ansamblul rezultatelor prezentate reiese că fracționarea cromatografică a hidrolizatului alcalin de r-RNA din *A. niger* este diferită față de separarea obținută pentru un amestec de AMP, CMP, GMP și UMP standard. În cazul hidrolizatului alcalin de r-RNA, coloana de Dowex 2X8 a permis separarea foarte bună a CMP și AMP, care s-au dovedit pure atît spectrofotometric cît și prin cromatografie în strat subțire. Capacitatea de rezoluție a sistemului a fost însă mult mai slabă în ceea ce privește separarea GMP și UMP, care după cum se vede și din curba de eluție a amestecului de nucleotide standard, au volume de eluție foarte asemănătoare. În acest sens, gradientul de acid formic 0,1M—1M (7) pare mai puțin recomandabil de cît cel de acid formic-formiat de amoniu (15) pentru buna separare a nucleotidelor, dar are avantajul că permite obținerea acestora în volume de eluție mult mai mici, deci scurtarea timpului de lucru.

În cazul hidrolizatului alcalin, prin cromatografia pe coloană de Dowex 2X8 obținem fracția III care nu a putut fi identificată ca fiind una din nucleotidele standard folosite sau un izomer al acestora. Fracția III reprezintă 3,3%.

Prin analiza prin cromatografie în strat subțire am reușit să identificăm GMP și UNP în fracțiunea IV a hidrolizatului alcalin de r-RNA. Totodată prin cromatografie în strat subțire se separă cei doi izomeri ai GMP atît în hidrolizatul alcalin de r-RNA cît și în cazul nucleotidelor standard pentru care și CMP este rezolvat în cei doi izomeri. Cromatografia în strat subțire în sistemele folosite (8) (9) nu rezolvă însă izomerii AMP și UMP conținuți în nucleotidele standard utilizate. Totuși, această tehnică se dovedește a fi utilă în analiza calitativă și cantitativă a nucleotidelor, atît prin cantitățile mici necesare unei determinări cît și prin timpul relativ scurt necesar petru efectuarea analizelor.

CONCLUZII

1. Cromatografia pe Dowex 2X8 în gradient discontinuu de acid formic (0,1M—1M) permite separarea CMP și AMP și nu rezolvă GMP și UMP rezultați în urma hidrolizei alcaline a r-RNA din *A. niger*. Hidrolizatul alcalin conține în plus o fracție în cantitate mică, omogenă din punct de vedere al cromatografiei în strat subțire, neidentificată însă.

2. Cromatografia în strat subțire separă GMP și UMP și în plus rezolvă cei 2 izomeri ai GMP.

3. Nucleotidele standard folosite care sînt un amestec de izomeri 3'(2') nu au putut fi separați prin cromatografie în strat subțire decît în cazul CMP și GMP.

Prezentat la redacție
la 8 iunie 1977

Institutul de Științe Biologice
Sectorul de Acizi nucleici și biosinteza enzimelor

NUCLEOTIDE COMPOSITION OF RIBOZOMAL RNA FROM A. *NIGER*

(SUMMARY)

r-RNAs were extracted with 3M potassium acetate from the total nucleic acid preparation of *A. niger*; they were alkali hydrolyzed and chromatographically analysed on Dowex 2X8 in discontinuous formic acid gradient (0.1M—1M). The chromatographic fractions were spectrophotometrically and thin layer chromatographically (TLC) characterized. The chromatography on Dowex 2X8 allows a good separation of CMP and AMP, but it does not resolve GMP and UMP in the alkali hydrolyzed. product. We have also noticed a small amount of a fraction different from the nucleotides mentioned. TLC resolves UMP and the two GMP isomers. 3' (2') isomers of the standard nucleotides were separated for CMP and GMP, but not for AMP and UMP.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **6**, 75 (1969).
2. S. Vasu, S. Rădulescu, St. cerc. biochim., **14**, 339 (1971).
3. S. Vasu, St. Hulea, Rev. roum. Biochim., **8**, 167 (1971).
4. S. Vasu, St. Hulea, S. Rădulescu, Rev. roum. Biochim., **8**, 351 (1971).
5. K. S. Kirby, Biochem. J., **96**, 266 (1965).
6. D. H. Marrian, V. L. Spicer, M. E. Balis, G. B. Brown, J. Biol. Chem., **189**, 533 (1951).
7. W. E. Cohn, J. Amer. Chem. Soc., **72**, 1471 (1950).
8. K. Randerath, B. B. Res. Com., **6**, 452 (1961 / 1962).
9. K. Randerath, Nature, **194**, 768 (1962).
10. S. Vasu, Rev. roum. Biochim., **6**, 75 (1969).
11. E. Chargaff, J. D. Davidson, The Nucleic Acids, vol. II, 513 (1955).
12. R. C. Noyer, R. Storck, Arch. Biochem. Biophys., **104**, 193 (1964).
13. S. O. Uryson, A. N. Belozerskii, Dokl. Acad. Nauk SSSR, **132**, 708 (1960).
14. M. Ederman, M. Verma, Z. Littauer, J. Mol. Biol., **49**, 67 (1970).
15. H. Hanney, R. Storck, J. Bacter., **85**, 822, (1963).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 159—164, (1977)

EFECTUL IRADIERII BENZIL-PENICILINEI ŞI CLORAMFENICOLULUI ASUPRA CREŞTERII UNOR TULPINI DE E. COLI

ŞTEFANIA MARCOVSCHI, DOMNIŢA CRIŞAN, SILVIA VIERU

Rezumat. Interacţiunea cloramfenicolului şi benzil-penicilinei cu receptorii celulari bacterieni specifici este influenţată într-un mod periodic prin iradierea antibioticelor cu $\lambda = 546$ nm. Creşterea tulpinilor de E. coli B_{12} şi E. coli Y_{10-6} prezintă tipuri de răspuns diferenţiat la fiecare antibiotic iradiat. Aceste răspunsuri corespund unor activităţi antibiotice semnificativ crescute sau scăzute numai la anumiţi timpi de iradiere şi pot fi corelate cu mecanismele de rezistenţă bacteriană la antibiotice.

Studii anterioare ale interacţiunii substratelor enzimatice cu un cîmp electromagnetic, la $\lambda = 546$ nm, au demonstrat inducerea unor creşteri discontinue, periodice ale vitezei iniţiale de reacţie sau ale activităţii enzimatice specifice, corespunzînd unor timpi de iradiere a substratului, bine determinaţi (1, 2, 3, 4, 5). Conform terminologiei propuse de Comoroşan şi colab., timpul minim de iradiere ce induce primul efect de creştere a vitezei iniţiale de reacţie este notat t_m. Perioada fixă ce delimitează două asemenea creşteri succesive este notată τ. Creşterile de viteză iniţială de reacţie apar sub forma unor reale „semnale" în activitatea enzimatică, induse de timpii de iradiere „eficienţi", respectiv t_m, $t_m + \tau$, $t_m + 2\tau$ etc. Astfel t_m şi τ apar ca fiind determinaţi de enzimă, specifici pentru un sistem enzimatic dat, fiind consideraţi de autori ca adevăraţi parametri enzimatici noi (6, 7, 8, 9, 10). Aceşti parametri au fost identificaţi pentru un număr mare de sisteme enzimatice reglatoare, şi s-au dovedit a fi implicaţi într-un nou tip de mecanism de control. Specificitatea acestor doi parametri pentru un sistem enzimatic a sugerat extinderea investigării acestor parametri la o serie de interacţiuni biologice de înaltă specificitate, ca interacţiunile drog-receptor celular specific. Rezultatele anterioare au confirmat corelaţia parametrilor t_m şi τ cu mecanismele de rezistenţă bacteriană la antibiotice. Efectul indus prin iradiere a fost reprodus pe un număr de antibiotice şi s-au demonstrat modificări semnificative ale ratelor de creştere celulară la anumiţi timpi de iradiere a antibioticului, comparativ cu rata de creştere în prezenţa antibioticului neiradiat (11, 12, 13, 5). Continuînd această direcţie de investigare a interacţiunilor drog-receptor celular, abordăm în această lucrare studiul efectului iradierii cloramfenicolului şi benzil-penicilinei asupra creşterii unor tulpini de E. coli.

MATERIAL ŞI METODE

Surse şi condiţii de iradiere: sursele de lumină folosite pentru iradierea cloramfenicolului şi benzil-penicilinei sînt: o lampă de Hg, de înaltă presiune-General Electric tip GE H 100—A_4/T şi o lampă de tungsten General Electric tip CG—81A de 100 w. Expunerea substratului sau a antibioticului la timpii de iradiere selectaţi este determinată cu un dispozitiv tip Uni-

Blitz model VA 100—2, controlat electronic printr-un Diversatron timer (Vincent Ass., Adv. Electro-Mechanical Eng. Rochester, USA). Diafragma cu apertura de 2,5 cm este amplasată deasupra discului de material plastic ce conţine proba de antibiotic de iradiat. Precizia de măsurare a timpilor de iradiere este de ordinul 0,001 s. Sursa de iraiere Hg este montată la 17 cm înălţime faţă de suprafaţa ţintă de pulbere de antibiotic, iar cea de tungsten la 14 cm înălţime. Un filtru optic LKB Hg-mono $\lambda = 546$ nm, cu transmitanţa 30% este interpus pentru selectarea lungimii de undă optime de 546 nm. Nivelul iluminării la suprafaţa stratului de antibiotic a fost în toate seriile de experimente de $\sim 500\,fc$ (aproximativ 5350 Lx), măsurat la un luxmetru electronic tip Gossen Panlux.

Microorganisme şi condiţii de cultură: s-au utilizat tulpinile de E. coli B_{12} şi Y_{10-6} furnizate de Institutul Dr. I. Cantacuzino. Mediul de cultură: peptonă 1% (Bactopeptonă Difco)—NaCl 0,5% este utilizat atît pentru prepararea inoculului cît şi pentru determinarea sensibilităţii tulpinii la fiecare antibiotic, şi în experimentele de iradiere. Sensibilitatea la cloramfenicol şi benzil-penicilină este determinată prin metoda diluţiilor. Culturi de E. coli B_{12} sau Y_{10-6} incubate la 37°C timp de 20 ore sînt utilizate pentru inocularea unor diluţii seriale de cloramfenicol (Hemisuccinat de Na) sau de benzilpenicilină G crist. sare de potasiu termostabilă) în mediul de cultură. Concentraţiile de antibiotice testate au fost între 0,1 şi 40 μg/ml pentru cloramfenicol şi între 0,02 şi 2 000 U penicilină/ml pentru tulpina de E. coli B_{12} sensibilă, respectiv între 2 şi 10 000 U peniciplină/ml pentru tulpina E. coli Y_{10-6} rezistentă.

Rezistenţa la penicilină a fost determinată de diluţia maximă ce permite creşterea bacteriană la 37°C în 24 ore, utilizînd densitatea optică ca o măsură a creşterii. Între limitele de sensibilitate, rata aparentă de creştere este o funcţie liniară de concentraţia antibioticului (14). Panta curbei de creştere obţinută în prezenţa antibioticului are o relaţie de inversă proporţionalitate cu concentraţia antibioticului, atît în determinările turbidimetrice, cît şi în urmărirea creşterii prin numărători directe (15). De aceea, concentraţiile de antibiotic pentru experimentele de iradiere au fost selectate pe panta curbei doză de antibiotic-răspuns de creştere bacteriană. Aceaste concentraţii pentru tulpinile de E. coli investigate au fost: 10 U penicilină/ml pentru E. coli B_{12} sensibil la penicilină, 5000 U penicilină/ml pentru E. coli Y_{10-6} rezistent la penicilină şi respectiv 4 μg cloramfenicol/ml pentru E. coli B_{12} foarte sensibil la cloramfenicol. Iradierile sînt efectuate pe probe de antibiotic crist. respectiv 2,5 mg cloramfenicol-hemisuccinat Na, 1 mg benzilpenicilină pentru experimentele cu tulpina sensibilă de E. coli B_{12} şi respectiv 10 mg benzil-penicilină pentru experimentele cu tulpina rezistentă de E. coli Y_{10-6}. Aceste probe de antibiotic crist. uniform răspîndite pe un disc de material plastic sînt iradiate în condiţiile standard menţionate anterior, apoi dizolvate în apă bidistilată sterilă şi adăugate la mediul de cultură pentru a da concetraţiile finale precizate mai sus. Aceleaşi cantităţi de antibiotic neiradiat adăugat la mediul de cultură în aceleaşi concentraţii finale reprezintă probele-martor. Mediul de cultură ce conţine antibiotic neiradiat sau iradiat este inoculat şi se urmăreşte creşterea bacteriană măsurînd $DO_{540\ nm}$ a probelor timp de 24 ore utilizînd un spectrocolorimetru Bausch & Lomb Spectronic 20. Toate culturile au fost efectuate direct în tuburile colorimetrului Bausch & Lomb (11 × 100 mm), volumul mediului de cultură/tub fiind de 5 ml; culturile au fost incubate la 37°C. Creşterea $DO_{540\ nm}$ la 24 ore de cultură a fost utilizată ca o măsură a creşterii bacteriene.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Creşterea tulpinii E. coli B_{12} în prezenţa hemisuccinatului de cloramfenicol prezintă modificări semnificative ale ratei de creştere bacteriană numai în prezenţa antibioticului iradiat cu anumiţi timpi corespunzători valorilor $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s (tabela 1). Se obţine astfel o serie de trei „semnale", respectiv inhibiţii ale creşterii bacteriene mai marcate în prezenţa cloramfenicolului iradiat cu timpii 10 s, 30 s, 50 s, decît în prezenţa antibioticului neiradiat-martor. Orice alţi timpi de iradiere intermediari testaţi au corespuns unor creşteri bacteriene situate în domeniul de variaţie al culturilor martor (tabela 1). Această serie de semnale corespunzătoare valorilor $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s poate fi caracteristică pentru interacţiunea dintre cloramfenicol şi receptorul celular specific ribozomal tip 50S. Dată fiind evidenţierea efectului pe un număr de antibiotice şi mai ales un $t_m = 10$ s, $\tau = 20$ s pentru antibiotice cu acţiune asupra subunităţii ribozomale

50 S, ca mitomicina-C (16) se poate interpreta că această serie de semnale corespunde interacţiunii antibiotic-receptor celular ribozomal, interacţiune influenţată discontinuu, periodic prin iradierea antibioticului.

Tabela 1

Creşterea tulpinii sensibile E. coli B_{12} în prezenţa cloramfenicolului (Na-hemisuccinat) iradiat

Timp de iradiere a cloramfenicolului*	Creşterea $DO_{540\ nm}$ la 24 ore de cultură-medie ± D.S.—
C (culturi martor-antibiotic neiradiat)	0,218 ± 0,002
5 s	0,215 ± 0,002
10 s	0,186 ± 0,004
15 s	0,218 ± 0,003
20 s	0,216 ± 0,005
25 s	0,217 ± 0,004
30 s	0,187 ± 0,002
35 s	0,214 ± 0,003
40 s	0,217 ± 0,004
45 s	0,213 ± 0,002
50 s	0,184 ± 0,004
55 s	0,217 ± 0,003
60 s	0,218 ± 0,004
65 s	0,218 ± 0,003
70 s	0,218 ± 0,004

* 25 culturi mator cu cloramfenicol neiradiat au fost efectuate, iar pentru fiecare timp de iradiere testat au fost efectuate 5 probe iradiate separat şi lucrate în duplicat.

Tabela 2

Creşterea tulpinii sensibile E. coli B_{12} în prezenţa benzil-penicilinei iradiate

Timp de iradiere a benzil-penicilinei*	Creşterea $DO_{540\ nm}$ la 24 ore de cultură-medie ± D.S. —
O (culturi martor-antibiotic neiradiat)	0,465 ± 0,005
5 s	0,405 ± 0,011
10 s	0,463 ± 0,011
15 s	0,478 ± 0,009
20 s	0,464 ± 0,009
25 s	0,421 ± 0,007
30 s	0,471 ± 0,011
35 s	0,462 ± 0,006
40 s	0,461 ± 0,009
45 s	0,422 ± 0,009
50 s	0,465 ± 0,009
55 s	0,455 ± 0,009
60 s	0,454 ± 0,003
65 s	0,454 ± 0,008

* 20 culturi martor cu benzilpenicilină neiradiată au fost efectuate, iar pentru fiecare timp de iradiere testat au fost efectuate 5 probe iradiate separat şi lucrate în duplicat.

Tabela 3

Creşterea tulpinii sensibile E. coli B_{12} şi a tulpinii rezistente E. coli Y_{10-6} în prezenţa benzilpenicilinei iradiate cu o lampă de tungsten

Timp de iradiere a benzil-penicilinei*	Creşterea $DO_{540\ nm}$ la 24 ore de cultură-medie ± D.S. —	
O (culturi martor-antibioticneiradiat)	E. coli B_{12}	E. coli Y_{10-6}
	0,465 ± 0,005	0,496 ± 0,004
5 s (t_m)	0,400 ± 0,014	0,455 ± 0,005
15 s (t_m)	—	0,536 ± 0,006
25 s ($t_m + \tau$)	0,418 ± 0,011	0,44 ± 0,008
35 s ($t_m + \tau$)	—	0,521 ± 0,006
45 s ($t_m + 2\tau$)	0,409 ± 0,015	0,451 ± 0,003
55 s ($t_m + 2\tau$)	—	0,522 ± 0,003

* 20 culturi martor cu benzilpenicilină neiradiată au fost efectuate, pentru fiecare tulpină, iar pentru fiecare timp de iradiere testat au fost efectuate 5 probe iradiate separat şi lucrate în duplicat.

Creşterea tulpinilor de E. coli B în prezenţa benzil-penicilinei prezintă două tipuri de răspuns la acţiunea antibioticului iradiat, în funcţie de sensibilitatea sau rezistenţa tulpinii la acest antibiotic. Creşterea tulpinii E. coli B_{12} sensibilă la penicilină este mai eficient inhibată de penici-

lina iradiată 5, 25, 45 s decît de penicilina neiradiată sau de penicilina iradiată cu alţi timpi intermediari (tabela 2). Deci, parametrii t_m şi τ au valorile $t_m = 5$ s, $\tau = 20$ s pentru tulpina sensibiliă. Aceleaşi rezultate se obţin cu ambele surse de iradiere (tabela 3). Aceste creşteri periodice ale activităţii inhibitorii a antibioticului pot fi corelate cu mecanismul de acţiune la nivelul peretelui celular bacterian. Penicilina şi derivaţii săi acţionează interferînd cu biosinteza peretelui celular bacterian. Etapa de biosinteză în care intervine penicilina este transpeptidarea D-alaninei, în formarea punţilor pentapeptidice încrucişate. În etapa finală de formare a reţelei mucopeptidice cu punţi de acest tip, capătul liber al lanţului poliglicil este plasat în peptidul liniar al lanţului vecin. Formarea acestor punţi ce închid reţeaua are loc pe peretele celular, deci exterior membranei celulare, în absenţa ATP-ului sau altei surse de energie pentru biosinteză. Energia necesară formării acestor legături este furnizată prin reacţia de transpeptidare în care D-alanina terminală a pentapeptidului este eliberată (17, 18, 19). Această funcţie de transpeptidare este extrem de sensibilă la penicilină, aceasta fiind un analog al D-alanil-D-alaninei (18) şi legîndu-se de centrul activ al transpeptidazei. Datorită naturii acestui mecanism de acţiune s-a sugerat că penicilinaza poate fi de asemenea o transpeptidază modificată. Considerînd acest mecanism enzimatic de acţiune al antibioticului se poate prevedea că iradierea benzilpenicilinei ar putea determina modificări periodice ale interacţiunii antibiotic-receptor celular (enzimatic). Asemenea „semnale" se vor traduce, în mod necesar, prin scăderi concordante ale ratei de creştere bacteriană pentru aceiaşi timpi de iradiere. Rezultatele experimentale pe tulpina E. coli B_{12} sensibilă la penicilină confirmă această ipoteză de lucru, parametrii determinaţi fiind $t_m = 5$ s, $\tau = 20$ s. Rezultatele anterioare au adus această confirmare şi pentru o tulpină de B. subtilis sensibilă la penicilină (5). Întrucît acelaşi mod de acţiune este implicat şi pentru tulpinile bacteriene rezistente la penicilină, aceleaşi valori ale parametrilor t_m şi τ sînt de aşteptat. Într-adevăr, aceleaşi valori ale timpilor de iradiere eficienţi sînt obţinute în modelul experimental: tulpină E. coli Y_{10-6} rezistentă la penicilină în prezenţ benzil-penicilinei iradiate. Creşterea acestei tulpini este mai eficient inhibată de penicilina iradiată 5, 25, 45 s decît de penicilina neiradiată-martor sau penicilina iradiată cu alţi timpi intermediari

Tabela 4

Creşterea tulpinii rezistente E. coli Y_{10-6} în prezenţa benzil-penicilinei iradiate

Timp de iradiere a benzil-penicilinei*	Creşterea $DO_{540\,nm}$ la 24 ore de cultură-medie ± D.S. —
0 (culturi martor-antibiotic neiradiat)	0,496 ± 0,004
5 s	0,435 ± 0,007
10 s	0,496 ± 0,007
15 s	0,524 ± 0,004
20 s	0,490 ± 0,005
25 s	0,442 ± 0,004
30 s	0,486 ± 0,004
35 s	0,523 ± 0,002
40 s	0,487 ± 0,002
45 s	0,457 ± 0,005
50 s	0,497 ± 0,003
55 s	0,525 ± 0,004
60 s	0,499 ± 0,005
65 s	0,493 ± 0,006
70 s	0,498 ± 0,003
75 s	0,490 ± 0,005

* 20 culturi martor cu benzil-penicilină neiradiată au fost efectuate pentru fiecare tulpină, iar pentru fiecare timp de iradiere testat au fost efectuate 5 probe iradiate separat şi lucrate în duplicat.

(tabela 4). Deci, pentru penicilina iradiată corespunzător parametrilor $t_m = 5$ s, $\tau = 20$ s, interacțiunea cu receptorul celular enzimatic, probabil transpeptidoical peretelui celular este crescută, traducîndu-se prin creșterile activității inhibitorii a antibioticului, deci cu rate de creștere bacteriană semnificativ scăzute. În plus, tulpina rezistentă de E. coli Y_{10-6} prezintă scăderi ale inhibiției produse de antibioticul iradiat, traduse prin rate de creștere bacteriană superioare față de culturile martor (antibiotic neiradiat). Aceste scăderi ale activității antibiotice a benzil-penicilinei apar la timpii de iradiere de 15, 35 și 55 s, deci la valori ale parametrilor $t_m = 15$ s, $\tau = 20$ s (tabela 4). Aceleași rezultate se obțin cu ambele surse de iradiere (tabela 3). Întrucît rezistența la penicilină este corelată cu producerea penicilinazei, această scădere a activității inhibitorii a antibioticului poate fi explicată prin creșterile de tip semnal induse de benzil-penicilină iradiată în activitatea penicilinazică. Această ipoteză a fost confirmată anterior prin demonstrarea concordanței dintre creșterile de viteză induse în reacția penicinilinazică de antibioticul iradiat corespunzător $t_m = 15$ s, $\tau = 20$ s cu scăderile de activitate inhibitorie a penicilinei asupra tulpinilor bacteriene rezistente (18). Această concordanță arată că interacțiunea penicilinei iradiate 15, 35, 55 s cu receptorul celular specific-penicilinaza este stimulată și determină creșteri ale vitezei de reacție penicilinazică și scăderi concordante ale activității antibiotice. Determinarea parametrilor t_m și τ poate fi deci utilă în investigarea unor interacțiuni specifice de tip drog-receptor celular, iar stimularea acestei interacțiuni prin efectul de iradiere al antibioticelor poate fi utilizată în investigarea mecanismelor de rezistența bacteriană.

Prezentat la redacție
la 27 aprilie 1977

SPITALUL CLINIC FUNDENI
București, Laboratorul de Biochimie

THE EFFECT OF BENZYLPENICILLIN AND CHLORAMPHENICOL IRRADIATION ON THE GROWTH OF *E. Coli* STRAINS

(SUMMARY)

The interaction between chloramphenicol or benzylpenicillin and the specific microbial cell receptors is influenced periodically through the irradiation of antibiotics with $\lambda = 546$ nm. The growth of the *E. coli* B_{12} and *E. coli* Y_{10-6} strains presents different types of response to each of the irradiated antibiotics. These responses correspond to significantly increased or decreased antibiotic activities, only for certain well-defined irradiation times and may be correlated with the mechanisms of microbial resistance to antibiotics.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Comoroșan, Nature, **227**, 64 (1970).
2. S. Comoroșan, P. Murgoci, Bull. Math. Biophys., **33**, 373 (1971).
3. S. Comoroșan, S. Vieru, P. Murgoci, Biochim. Biophys. Acta, **268**, 620 (1972).
4. S. Comoroșan, M. Cru, S. Vieru, Enzymologia, **42**, 31 (1972).

5. R. L. Sherman, W. Yee, S. Comoroşan, D. Crişan, S. Marcovschi, Chemotherapy, **20**, 227 (1974).
6. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Şandru, P. Murgoci, Physiol. Chem. Physics, **3**, 1 (1971).
7. S. Comoroşan, P. Morgoci, D. Şandru, M. Cru, Physiol. Chem. Physics, **3**, 343 (1971).
8. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Şandru, P. Murgoci, E. Alexandrescu, Physiol. Chem. Physics, **3**, 103 (1971).
9. S. Comoroşan, D. Crişan, E. Alexandrescu, P. Murgoci, Physiol. Chem. Physicis , **4**, 559 (1972).
10. S. Comoroşan, M. Cru, P. Murgoci, S. Vieru, Physiol. Chem. Physics, **4**, 1 (1972).
11. G. E. Bass, D. Crişan, Physiol. Chem. Physics, **5**, 331 (1973).
12. S. Comoroşan, R. L. Sherman, Int. Symp. Atomic Molec. and Solid-State Theory and Quantum Biology, Sanibel Island (1973).
13. D. Crişan, S. Marcovschi, S. Comoroşan, St. cerc. biochim., **17**, 253 (1974).
14. F. Kavanagh, Appl. Microbiol., **16**, 777 (1968).
15. F. R. Carret, G. H. Miller, M. R. W. Brown, J. Pharm. Sci., **55**, 593 (1966).
16. S. Marcovschi, D. Crişan, S. Comoroşan, St. cerc. biochim., **19**, 49 (1976).
17. W. Carter, K. S. McCarty, Ann. Int. Med., **64**, 1087 (1966).
18. D. J. Tipper, J. L. Strominger, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **54**, 1133 (1965).
19. F. M. Wise Jr., J. T. Park, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **54**, 75 (1965).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 165—168 (1977)

CONŢINUTUL ÎN AZOT PROTEIC ŞI ÎN APĂ LA DOUĂ SPECII DE ALGE DIN MEDIU DE VIAŢĂ DIFERIT

VIORICA MOGA

Rezumat. — Probe de alge din speciile *Enteromorpha intestinalis* şi *Enteromorpha linza*, după o prealabilă uscare, au fost supuse determinărilor biochimice de azot proteic. S-a obţinut ca medie a zece determinări un conţinut în azot proteic 3,18 g% la alga marină *Ent. linza* şi 2,54 g% la alga de apă dulce *Ent. intestinalis*.

Cercetările cu privire la alge rămîn deschise, asupra lor efectuîndu-se studii biochimice numeroase şi complexe. Putem aminti studiile privind valoarea nutritivă a algelor semnate de cercetătorii români Mircea Dinu şi Blazena Vîlcu (1). În ceea ce priveşte conţinutul în azot proteic se amintesc printre alţii : N.N. Alfimov (2), A. Hattori (3) şi Villeret (4). Rezultatele obţinute de aceşti autori indică un conţinut ridicat al fracţiunii de azot proteic la speciile de alge studiate.
Cunoaşterea compoziţiei chimice a algelor este foarte importantă, acestea fiind cotate drept sursă potenţială de acoperire a necesităţilor de hrană.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au luat în studiu două specii de alge verzi din mediu de viaţă diferit :

— alga *Enteromorpha intestinalis* (L) Link, colectată în octombrie din apa băilor Someşeni (jud. Cluj).

— alga *Enteromorpha linza* (L) J. G. Ag. colectată în septembrie de pe litoralul românesc al Mării Negre (Agigea).

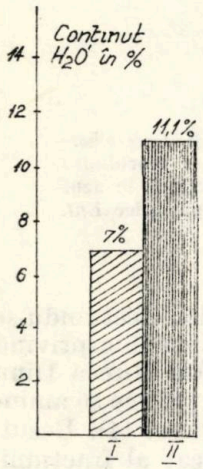
Materialul a fost conservat prin uscare rapidă în termostat la 35°C. (Vezi nota noastră nr. 4). Apoi s-a determinat conţinutul în apă al celor două specii de alge prin cîntărirea la o balaţă de torsiune, înainte şi după uscarea probelor la etuvă (105°C) timp de o oră. Metoda de dozare a fracţiunii de azot proteic a fost micro-Kjeldahl (5). S-a lucrat cu probe de 50 mg. algă uscată, omogenizată la un Poter de sticlă. Precipitarea proteinelor se face cu o soluţie de HCl conc. + 3% acetonă. Mineralizarea precipitatului proteic s-a făcut prin micro-Kjeldahlizare, iar în calcule s-a ţinut seama de proba oarbă cu reactivi.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Utilizînd metoda micro-Kjeldahl pentru dozarea azotului proteic din algele *Ent. linza* şi *Ent. intestinalis* am obţinut următoarele rezultate (vezi fig. 1—2 şi tabelul).

Din tabel se observă că fiecare rezultat reprezintă media a 10 determinări, medie ce de altfel indică : alga marină *Ent. linza* are un conţiut în azot proteic mai ridicat decît cel al algei *Ent. intestinalis*. Datele obţinute de noi pot fi comparabile cu cele citate în literatura de specialitate. Impor-

tant de menţionat este faptul că vîrsta algelor, precum şi epoca de recoltare, influenţează asupra compoziţiei în azot proteic a algelor, acesta fiind scăzut la culturile tinere. Dar vîrsta afectează conţinutul în azot proteic algelor marine într-o măsură mai mică decît al algelor de apă dulce (6).



←Fig. 1. — Reprezentarea grafică a conţinutului în apă la algele *Enteromorpha intestinalis* (I) şi *Enteromorpha linza* (II)

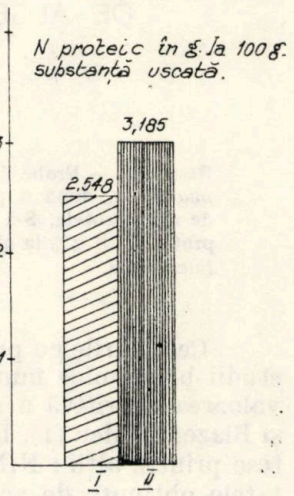


Fig. 2. — Reprezentarea grafică→ a azotului proteic din algele *Ent. intestinalis* (I) şi *Ent. linza* (II) exprimat în g/100g substanţă uscată.

Tabel

Conţinutul în apă şi în azot proteic la algele *Ent. linza* şi *Ent. intestinalis*

ALGA	Nr. probe	Conţinutul în apă exprimat în %	MEDIA	Conţinutul în N proteic g/100 g. subst. uscată	MEDIA
Ent. intestinalis	1	11,3	7,1%	2,240	2,54%
	2	7,1		2,222	
	3	5,0		2,346	
	4	6,9		2,750	
	5	7,3		2,422	
	6	5,0		2,874	
	7	9,8		2,674	
	8	5,4		2,548	
	9	7,0		2,856	
	10	7,2		2,548	
Ent. linza	1	11,05	11,10%	3,480	3,18%
	2	10,33		3,230	
	3	10,86		2,883	
	4	11,15		3,185	
	5	10,90		3,286	
	6	11,10		3,140	
	7	11,33		3,084	
	8	10,66		2,912	
	9	11,30		3,487	
	10	11,24		3,160	

Cele două specii de alge studiate de noi au fost recoltate în stare matură, iar determinările s-au efectuat asupra mai multor fracţiuni din exemplare diferite. Ele au un conţinut în azot proteic mai scăzut decît

alga unicelulară *Chlorella pyrenoidosa*, la care fracțiunea de N proteic reprezintă 4,3% din substanța uscată (7).

Comparînd rezultatele obținute de noi cu cele obținute de S. Villeret (4), la cîteva *Rodophyceae* de apă dulce se poate preciza :
— ambele specii studiate au un conținut în azot proteic mai ridicat decît reprezentanții *g. Lemanea* și mai scăzut decît la reprezentanții *g. Batracospermum* și *Sacheria*.
— conținutul în azot proteic la alga verde marină *Ent. linza* se apropie de cel al algei de apă dulce *Sacheria*.
— conținutul în apă al algei *Ent. intestinalis* se situează în jurul valorilor obținute de S. Villeret pentru reprezentanții celor trei specii de apă dulce studiate (4).

La aceleași specii de alge la care noi am determinat azotul proteic s-au făcut anterior și determinări de aminoacizi liberi (8).

CONCLUZII

Analizînd rezultatele obținute se poate preciza :
conținutul mai ridicat de apă la algele marine face ca și conținutul în substanță uscată, raportat la aceeași unitate de algă verde, să fie mai scăzut la algele marine decît la cele din apele continentale. Aceasta impune ca pentru obținerea unei cantități identice de substanță uscată, masa de algă verde luată în cultură pentru mediu marin să fie mai mare. Din determinările efectuate de noi, rezultă că la g/substanță uscată, conținutul în aminoacizi liberi (8) și în azot proteic este mai ridicat la algele din mediu marin decît la cele din apele continentale. Absența histidinei din algele din apele continentale (8), conținutul ridicat al fracțiunii de azot proteic din algele marine fac ca ultimele să rămînă în studiu ca o eventuală sursă de hrană pentru animale și om.

Prezentat la redacție
12, mai, 1976

Spitalul județean Alba Iulia

THE CONTENT IN PROTEIN NITROGEN AND WATER OF TWO SPECIES OF GREEN ALGAS, FROM DIFFERENT ENVIRONMENTS

(SUMMARY)

Enteromorpha intestinalis and *Enteromorpha linza*, green algas species, were dried and analysed for their protein nitrogen. The mean of ten determinations showed a protein nitrogen content of 3,18 g% marine alga *Ent. linza*, and 2,54 g% of continental water *Ent. intestinalis*.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Dinu, B. Vîlcu, Natura, august, 13—20 (1968).
2. N. N. Alfimov, Bot. Jurn. *E. 48, 1,* 132—135 (1963).
3. A. Hattori, J. Biochem. *E. 45, 1,* 57—64 (1958).
4. S. Villeret, Bull. Soc. Scient. Bretagne, *41,* 289—297 (1967).
5. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic și cercetare,* 309, București, (1960), ed. Medicală.
6. V. Pillai, Proc. Indian. Acad. Sci., *B. 45, 2,* 43—63 (1957).
7. M. Sisakian, F. Besinger, M. Saposnikova, Probl. Kosmis. Biol. „*A. N. URSS*", 371—376 (1962).
8. V. Moga, St. Cerc. Biochim., *18,* 13—16 (1975).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, **20**, *2*, 169–175 (1977)

PURIFICAREA ŞI UNELE PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE ŞI CINETICE ALE MALATDEHIDROGENAZEI MITOCONDRIALE

NATALIA MOLDOVEANU, A. RADU

Rezumat. — S-a purificat malat dehidrogenaza (MDH) mitocondrială din inimă de bovină, prin îndepărtarea MDH citoplasmatice, prepararea şi extracţia pudrei acetonice, precipitare cu fosfat de calciu, precipitare cu sulfat de amoniu, precitare cu alcool, reprecipitări cu sulfat de amoniu şi cromatografie pe DEAE-celuloză. Preparatul prezintă un grad înalt de puritate (evidenţiat cromatografic şi electroforetic) şi o activitate specifică ridicată (570 μmoli NADH oxidat/min/mg proteină). S-a testat stabilitatea enzimei precum şi cinetica de reacţie în funcţie de pH şi în funcţie de cele patru substrate (oxaloacetat, malat, NADH şi NAD). Constantele K_m = 3,5 . 10 M^{-5} faţă de oxaloacetat; 1,3 . 10^{-3} M faţă de malat; 3,8 . 10^{-5} M în funcţie de NADH şi 1,8 . 10^{-4} M la concetraţii variabile de NAD. S-a evidenţiat inhibiţia determinată de iodacetamidă şi efectul protector al următoarelor substanţe, în ordinea menţionată: NADH > oxaloacetat > malat > NAD > ATP > fosfat anorganic.

Malat dehidrogenaza sau L-malat NAD-oxidoreductaza (EC 1.1.1. 37) catalizează reacţia de convertire reversibilă a L-malatului în oxaloacetat.

$$\text{L-malat} + \text{NAD}^+ \overset{\text{MDN}}{\rightleftharpoons} \text{oxaloacetat} + \text{NAD} + \text{H}^+$$

Enzima este omniprezentă în lumea vie. A fost cercetată în ţesuturi animale, plante şi microorganisme. Celulele animalelor superioare conţin două forme de malat dehidrogenază, una în mitocondrii (în matricea mitocondrială) şi alta în citoplasma extramitocondrială. Cele două enzime sînt formate din două subunităţi (monomeri), au aceeaşi funcţie catalitică, dar prezintă unele diferenţe în structura primară (compoziţie în aminoacizi), şi au o comportare cinetică diferită, avînd centri activi diferiţi (1)–(4).

MDH participă în o serie de procese importante în organism ca: ciclul acizilor tricarboxilici (care au loc în mitocondrii), gliconeogeneza hepatică (în mitocondrii şi citoplasmă), transferul de H^+ din citoplasmă în mitocondrii, transferul de H^+ de la NADH + H^+ către $NADP^+$ (5).

Dat fiind rolul jucat de această enzimă în organism, studiul cineticii şi structurii ei ocupă un loc important în preocupările actuale ale enzimologilor. Obţinerea unor preparate enzimatice de înaltă puritate prezintă şi un interes practic, MDH fiind o enzimă necesară pentru dozarea oxaloacetatului şi malatului, putînd fi folosită şi ca enzimă intermediară în determinarea activităţii aspartat aminotransferazei.

În lucrarea de faţă prezentăm procedeul prin care am obţinut MDH mitocondrială din inimă de bovină şi de asemeni o serie de proprietăţi ale enzimei purificate.

MATERIAL ŞI METODE

Enzima a fost purificată după indicaţiile date de Ochoa (6), Wolfe şi Neilands (7) şi Thorne (8) şi adaptată de noi după cum vom menţiona la capitolul „Rezultate şi discuţii".

Determinarea conţinutului proteic s-a făcut după metoda Warburg şi Cristian (9), densitatea optică a soluţiilor proteice fiind citite la 260 şi 280 nm. S-a urmărit determinarea activităţii enzimatice MDH atît în sensul transformării oxaloacetat — malat, cît şi în sens invers. În primul caz reducerea oxaloacetatului s-a făcut în prezenţa NDAH care oxidîndu-se la NAD^+ determină scăderea extincţiei la 340 nm. Compoziţia mediului de reacţie a fost : tampon TRIS —HCl 0,1 M, pH 7,4, 0,125 mM NADH, 3 μg enzimă, 0,01—1 mM oxaloacetat. Activitatea enzimatică s-a exprimat în μmoli NADHoxidat/min/mg proteină. În al doilea caz compoziţia mediului de redacţie a fost : tampon glicocol-NaOH 0,1 M, pH 9,8, 1mN NAD, 0,05—10 mM malat. Activitatea enzimei s-a exprimat în μmoli NAD redus/min/mg proteină. Controlul preparatului enzimatic obţinut a fost făcut prin electroforeză în disc, în tampon TRIS-glicocol, pH 9, 0, iar vizualizarea activităţii MDH s-a efectat pe baza reacţiilor date de Markert şi Moller (10), cu 0,1 mg fenazinmetosulfat, 5 mg nitrobluetetrazolium, 5 mg NAD şi 10 mM malat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La început vom descrie procedeul prin care am obţinut MDH din inimă de bovină şi apoi vom prezenta unele proprietăţi cinetice ale preparatului purificat.

Indepărtarea MDH citoplasmatice. Inima de bovină proaspătă se curăţă de grăsime şi ţesut conjunctiv şi se toacă printr-o maşină de tocat carne (răcită în prealabil). Toate operaţiile care urmează se efectuează la 0—3° C. Muşchiul tocat se spală de două ori cu cîte 10 volume de apă rece şi se filtrează.

Prepararea pudrei acetonice. Muşchiul mărunţit şi spălat se omogenizează în 3 volume acetonă (90%). După filtrare reziduul se extrage cu 3 volume acetonă (100%). Reziduul este uscat şi mojarat pînă ce se obţine o pudră fină.

Extracţia pudrei acetonice. Pudra acetonică se extrage în tampon fosfat, pH 7,4, se centrifughează, iar reziduul este reextras cu 3 volume tampon-fosfat.

Precipitarea fosfatului de calciu. La extracul de fosfat se adaugă clorură de calciu (15%). Precipitatul de fosfat de calciu depus se centrifughează şi este aruncat. Soluţia supernatantă se neutralizează cu fosfat trisodic. Precipitatul se îndepărtează prin centrifugare.

Fracţionarea cu sulfat de amoniu. Supernatantul se precipită cu sulfat de amoniu 50%, iar amestecul se filtrează. Filtratul se reprecipită cu sulfat de amoniu 65%. Precipitatul depus după 1 oră se centrifughează la 13 000 g şi se reia în apă distilată.

Precipitarea cu alcool în prezenţa sulfatului de amoniu. Se realizează o concentraţie în sulfat de amoniu de 20% şi se adaugă un volum etanol. Amestecul se lasă timp de 18 ore. Precipitatul care se formează este centrifugat şi îndepărtat. Supernatantul se precipită cu etanol (0,5 volume) şi se lasă timp de 18 ore. Precipitatul depus se centrifughează, se dizolvă în apă distilată şi se dializează faţă de tampon fosfat.

Refracţionarea cu sulfat de amoniu. Soluţia obţinută din etapa anterioară se reprecipită cu sulfat de amoniu la 50 şi 65% saturaţie, ca în etapa menţionată anterior. Precipitatul este dizolvat în apă şi dializat faţă de tampon TRIS-HCl, 0,04 M.

Cromatografia pe DEAE-celuloză. Soluția de enzimă dializată a fost trecută pe o coloană de DEAE-celuloză și eluată cu tampon TRIS 0,04 M, pH 8,2. Diagrama de separare a MDH mitocondriale este dată în fig. 1.

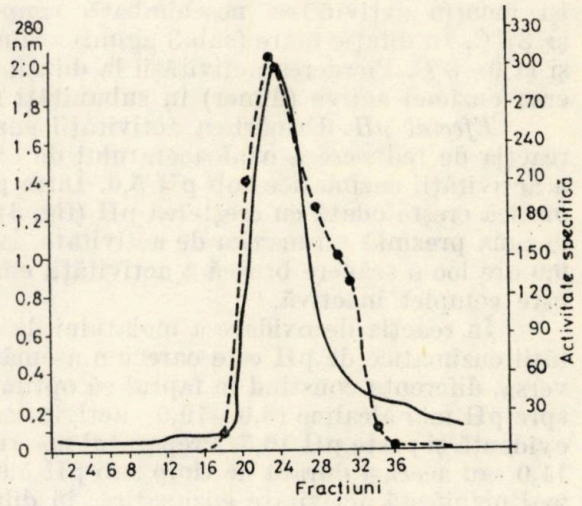


Fig. 1. — Diagrama de separare a MDH mitocondriale pe DEAE-celuloză. Tampon de eluție TRIS—HCl 0,04 M, pH 8,2. (– – –) Curba pt. proteină ;(——) Activitatea MDH

MDH eluată a fost precipitată din nou succesiv cu sulfat de amoniu 50 și 65 %. Enzima s-a păstrat în sulfat de amoniu 65 %, la 3°C.

Activitatea specifică a enzimei pe parcursul diverselor etape de purificare este dată în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul proteic și activitatea specifică pe parcursul a diverse etape de purificare

Etapele de purificare	Proteină mg	Acivitatea specifică (în tempon fosfat, determinată după 15 sec de reacție)
1. Extractul de pudră acetonică	10 320	4,53
2. Supernatantul de fosfat de calciu	5 350	6,42
3. Fracțiunea precipitată cu sulfat de amoniu 50—65 %	669	12,27
4. Fracțiunea precipitată cu etanol	215	130
5. MDH eluată pe DEAE-celuloză	150	340
6. Enzima reprecipitată cu sulfat de amoniu	80	570

După cum reiese din tabela 1, odată cu creșterea gradului de puritate, pe parcursul a diverse etape de purificare, are loc și o scădere a conținutului proteic concomitent cu creșterea activității specifice a preparatului.

Electroforeza în disc a MDH. Gradul de puritate al preparatului obținut a fost controlat și prin disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă, în tampon TRIS-glicocol, pH 9,0. După cum reiese din fig. 2 prin electro-

foreza în disc a preparatului obținut apare o singură bandă cu activitate MDH corespunzătoare MDH mitocondriale, (11).

Stabilitatea enzimei. Preparatul de MDH obținute de noi (20 mg/ml), păstrat la 0—3° C, își menține activitatea cel puțin 1 an fără pierdere semnificativă a activității enzimatice. Soluțile diluate de enzimă, pînă la 50μg/ml își mențin activitatea neschimbată timp de mai multe ore, la 25° și 37°C. În diluție mare (sub 3 μg/ml) enzima este nestabilă în timp chiar și la 0—3°C. Pierderea activității la diluții înalte poate să reflecte disocierea enzimei active (dimer) în subunități (monomeri).

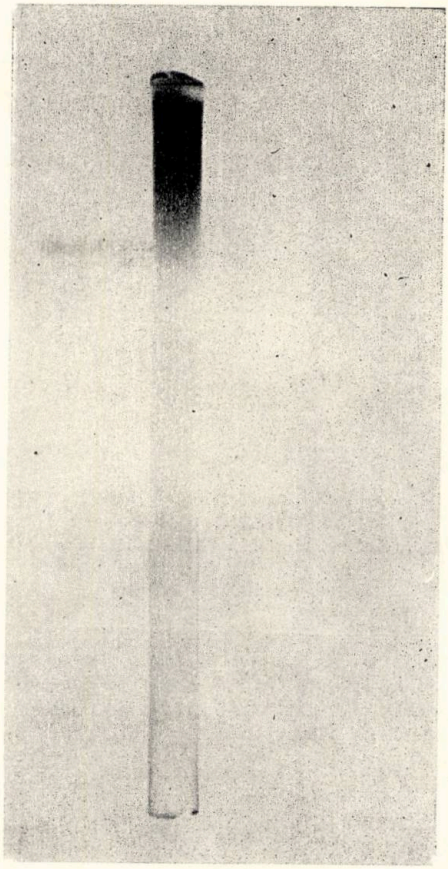
Efectul pH. Urmărirea activității enzimatice la diverse pH-uri, în reacția de reducere a oxaloacetatului de către NADH a indicat o lipsă a activității enzimatice sub pH 5,0. Între pH 5,5 și 7,0 activitatea enzimatică crește odată cu creșterea pH (fig. 3). În domeniul de pH 7,5—9,0 enzima prezintă un maxim de activitate, iar prin creșterea pH-ului peste 9,0 are loc o scădere bruscă a activității enzimatice. La pH 10,5 enzima este complet inactivă.

În reacția de oxidare a malatului de către NAD, dependeța activității enzimatice de pH este oarecum asemănătoare cu cea din reacția inversă, diferența constînd în faptul că optimum de activitate este deplasat spre pH mai alcaline (8,0—10,0), activitatea enzimatică putînd fi pusă în evidență și peste pH 10,5. Preparatul nostru menținut 15 min la pH peste 11,0 sau aceeași durată de timp sub pH 5,0 și adus apoi la pH optim nu mai manifestă activitate enzimatică, în diluția folosită de noi. Pierderea activității este probabil datorită unui proces de agregare a moleculei enzimei cu formare de polimeri.

Cinetica de reacție în funcție de substrate. În cele ce urmează vom reda rezultatele obținute asupra comportării malat dehidrogenazei mitocondriale față de cele patru substrate care intervin în reacția catalizată de această enzimă, respectiv oxaloacetat, malat, NADH și NAD. Folosind ca substrat variabil oxaloacetatul și păstrînd o concentrație constantă de NADH, am constatat (fig. 4) o creștere a activității enzimatice concomitent cu creșterea concentrației oxaloacetatului pînă la 0,125 mM, menținerea unei activități optime între 0,125—0,250 mM și scăderea activității la concentrații de peste 0,250 mM. Datele obținute de noi, cu enzime purificată din inimă de bovină pledează în favoarea efectului inhibitor determinat de concentrații înalte de oxaloacetat, constatată și de alți autori (13) (14), pe preparate de diverse proveniențe ale enzimei mitocondriale. Acest efect inhibitor al oxaloacetatului a fost pus în evidență numai pentru MDH mitocondrială, enzima citoplasmatică nefiind afectată de concentrațiile mari de oxaloacetat (12). Kaplan (17) a sugerat că forma mitocondrială este mai bine orientată spre oxidarea malatului, pe cînd forma citoplasmatică favorizează reducerea oxaloacetatului. Pe de o parte, enzima mitocondrială s-a adaptat să recunoască oxalocetatul drept produs final al reacției catalizate de MDH, pe de altă parte, utilizarea rapidă a oxaloacetatului permite ca reacția să poată avea loc în ambele sensuri la concentrații mici de oxaloacetat, în funcție de condițiile din mitocondrii și necesitățile organismului.

Folosind concentrații variabile de malat (0,05—10 mM) și o concentrație constantă de NAD (1 mM), am constatat o creștere a vitezei de reacție proporțională cu creșterea concentrației de malat (fig. 5). După

Fig. 2. — Vizualizarea activității MDH mitocondrale purificată din inimă de bovină. Disc-electroforeza a fost efectuată în poliacrilamidă în tampon TRIS-glicocol, pH 9,0.



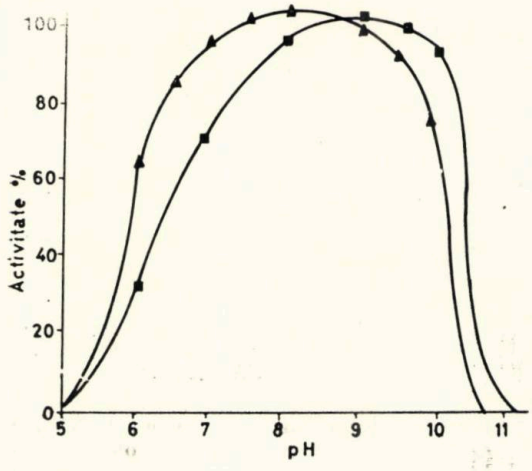


Fig. 3. — Efectul pH-ului asupra MDH mitocondrială purificată din inimă de bovină. Activitatea a fost determinată în tampon fosfat 0,05 M, iar creşterea şi scăderea pH-ului a fost realizată prin adăugarea de NaOH 2 M şi respectiv HCl 2 M.

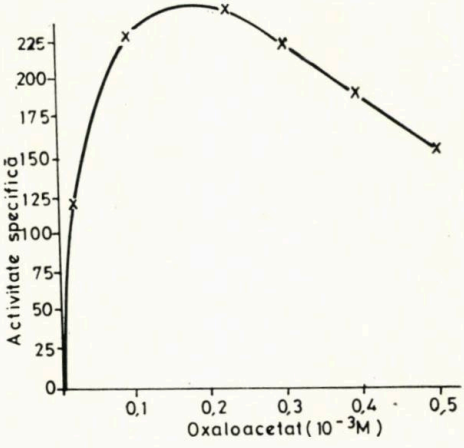


Fig. 4. — Curba de saturare a MDH mitocondriale față de oxaloacetat (0,010—1 mM) în prezența de NADH (0,125 mM), în tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,5 și 3 μg enzimă. Activitatea specifică = NADH oxidat/min/mg proteină.

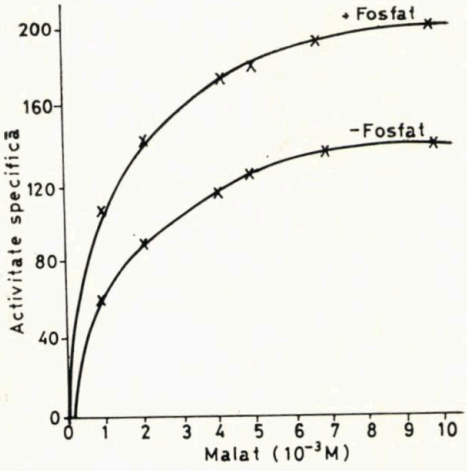


Fig. 5. — Efectul concentrațiilor crescînde de malat (0,050—10 mM) asupra activității MDH mitocondriale, în prezență de NAD (1 mM), în tampon glicocol NaOH, pH 9,8, cu și fără adaos de 10 mM fosfat (3 μg enzimă).

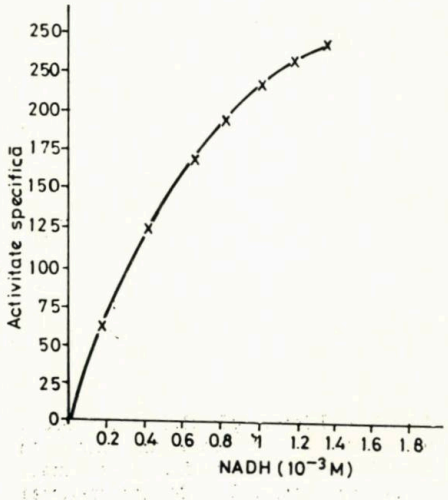


Fig. 6. — Curba de saturare a MDH față de NADH 0,01—0,15 mM în prezență de oxaloacetat (0,125 mM), în tampon TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,5 (cantitatea de enzimă ca în fig. 4).

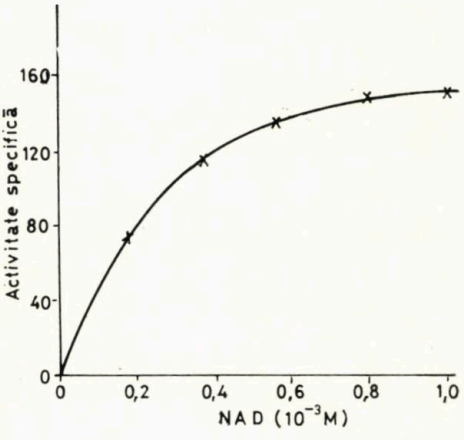


Fig. 7. — Curba de saturare a MDH față de NAD (0,05—1 mM) în tampon glicocol-NaOH 0,1 M, pH 9,8 în prezență de 10 mM malat. Celelalte condiții ca în fig. 5.

cum reiese din figură, în prezența a 10 mM fosfat de potasiu, viteza de reacție este mai mare. Creșterea concentrației de malat nu afectează activitatea MDH mitocondriale. La concentrații crescute de malat este inhibată însă MDH citoplasmatică după cum afirmă Englard (14) și Frieden și col. (12).

Prin urmărirea efectului concentrațiilor crescînde de NADH la o concentrație constantă de oxaloacetat (0,125 mM), am constatat o creștere a vitezei de reacție între 0,010—0,15 mM NADH, după cum reiese din fig. 6.

Viteza de oxidare a malatului în prezența concentrațiilor variabile de NAD (0,05—2 mM) ne-a indicat o creștere a vitezei de reacție proporțională cu creșterea concentrațiilor de NAD pînă la 1 mM, ca apoi curba să se aplatizeze (fig. 7). Peste 2 mM NAD în mediu de reacție viteza rămîne constantă.

Determinarea constantelor K_m față de oxaloacetat a fost de 3,5 . 10^{-5} M; 1,3.10^{-3} M față de malat; 3,8 . 10^{-5} M față de NADH; și 1,8. 10^{-4} M în funcție de NAD.

Efectul iodacetamidei asupra MDH mitocondriale. Grupările —SH prezintă importanță pentru funcțiile catalitice ale MDH, limitarea acestora aducînd după sine și o diminuare sau chiar o pierdere a activității enzimatice. În fig. 8 dăm rezultatele obținute prin cercetarea efectului

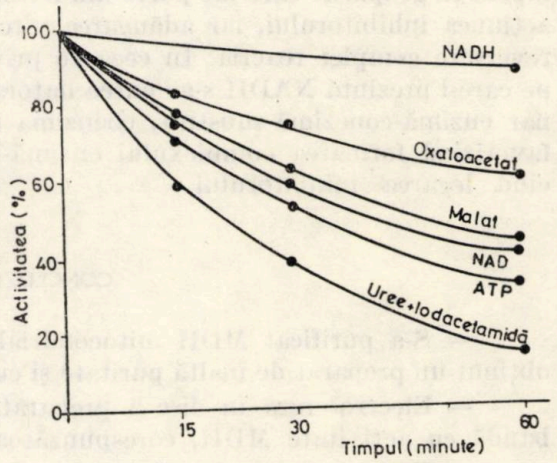


Fig. 8. — Inhibiția cu 1 mM iodacetamidă în prezența a 1 M uree și efectul protector al NADH (0,15 mM), oxaloacetat (0,15 mM), malat (1 mM), ATP (1 mM) și NAD (1 mM), preincubate cu enzima 5 min, înainte de acțiunea inhibitorului.

iodacetamidei (agent alchilant care reacționează cu grupările —SH) asupra enzimei. Am constatat că la o concentrație de 1 mM iodacetamidă și în prezența 1 M uree (care schimbă conformația moleculei enzimei în așa fel încît fac accesibile grupările —SH de a reacționa cu iodacetamida) are loc o inhibare a activității enzimatice care se accentuează odată cu timpul de incubare al inhibitorului cu enzima. Inhibiția determinată de iodacetamidă este ireversibilă, grupările — SH fiind blocate ireversibil cu formarea unui derivat covalent al enzimei

$$E-SH + ICH_2 - CONH_2 \rightarrow E-S-CH_2-CO-NH_2 + HI$$

Urmărind efectul iodacetamidei asupra enzimei preincubate cu cele patru substrate care intervin în reacția catalizată de MDH (oxaloacetat, malat, NADH și NAD) sau prin preincubarea enzimei cu ATP, am constatat că acestea determină o anumită protecție a enzimei față de inhibiția cu iodacetamidă.

După cum reiese din fig. 8, după 60 min de incubare a enzimei cu iodacetamida, în prezența ureei, inhibiția este de aproximativ 85% față de activitatea enzimei în absența inhibitorului; după preincubarea cu diverse substanțe este următoarea: 68% cu ATP, 59% cu NAD, 57% cumalat, 40% cu oxaloacetat și 10% cu NADH.

Efect protector asemănător cu ATP a avut și fosfatul de potasiu (dar într-o concentrație de 50 mM). Inhibiția determinată de iodacetamidă după 60 min în absența ureei, este de 70%.

După cum afirmă Gregory și col. (15), Seguin și col. (16) și Siegel și col. (2), în studiul lor cu agenți alchilanți ca: N-etilmaleimida, 5,5' — ditio bis (2-nitrobenzoat) și p-cloromercuribenzoat, cel puțin două grupări —SH din molecula MDH mitocondriale sînt incluse în legarea substratului și blocarea lor duce la pierderea activității enzimatice. Spre deosebire de MDH mitocondrială, MDH citoplasmatică nu este inhibată de agenții alchilanți menționați (2).

Efectul protector al substanțelor menționate se poate explica prin faptul că grupările care fac parte din locusul activ sînt ocupate înainte de acțiunea inhibitorului, iar adăugarea ulterioară a acestuia nu poate să reverseze complet reacția. În ceea ce privește gradul înalt de protecție pe care-l prezintă NADH s-ar putea datora faptului că în complexul ternar enzimă-conezimă-substrat, coenzima este cea care se leagă prima, favorizînd formarea complexului enzimă-NADH-oxaloacetat și împiedicînd legarea inhibitorului.

CONCLUZII

— S-a purificat MDH mitocondrială din inimă de bovină și s-a obținut un preparat de înaltă puritate și cu o activitate specifică ridicată.

— Electroforeza în disc a preparatului obținut a dat o singură bandă cu activitate MDH, corespunzătoare MDH mitocondriale.

— Urmărindu-se efectul substratelor (oxaloacetat, malat, NADH și NAD) asupra activității enzimei, s-a constatat o inhibare a activității specifice, determinată de creșterea concentrațiilor de oxaloacetat.

— Iodacetamida (1 mM, în prezența 1 M uree) determină o inhibare (85% a activității MDH).

— NADH, oxaloacetatul, malatul și NAD, ATP și fosfatul au un efect protector asupra enzimei, față de inhibiția cu iodacetamidă.

Prezentat la redacție
la 30 iunie 1977

Institutul de Științe Biologice
Colectivul de Enzimologie
Biochimie

PURIFICATION AND SOME PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE MITOCHONDRIAL MALATE DEHYDROGENASE

(SUMMARY)

Mitochondrial malate dehydrogenase (MDH) was purified from bovine heart, by the removal of the cytoplasm MDH, preparation and extraction of acetone powder, precipitation with calcium phosphate and ammonium sulphate, respectively, alcohol precipitation, differentiated ammonium sulphate precipitation, and DEAE-cellulose chromatography. The final preparation shows a high degree of purity (as proved chromatographically and electrophoretically and a high specific activity (570 μ moles NADH oxidized/min/mg protein). The enzyme stability, and the reaction kinetics, as a function of pH and the four substrates (oxaloacetate, malate, NADH and NAD) were also studied. The K_m values were determined as follows : $3{,}5 \cdot 10^{-5}$ M (for oxaloacetate) ; $1.3 \cdot 10^{-3}$ M (for malate) ; $3.8 \cdot 10^{-5}$ M (NADH) ; and $1.8 \cdot 10^{-4}$ M (for a variable concentration of NAD). The iodacetamide inhibition of the enzyme activity was revealed as well as the protective action against this inhibition, proved by the following compounds, in the mentioned order : NADH >oxaloacertate >malate >NAD >ATP >Pi.

BIBLIOGRAFIE

1. C. J. R. Thorne, Biochim. Biophys. Acta, *42*, 175 (1960).
2. L. Siegel, S. Englard, Biochim. Biophys. Acta, *64*, 101 (1962).
3. C. J. R. Thorne, P. M. Cooper, Biochim. Biophys. Acta, *81*, 397 (1963).
4. S. Englard, H.H. Breiger, Biochim. Biophys. Acta, *56*, 571 (1962).
5. E. Kun, The Enzymes, *7*, 149 (1963).
6. S. Ochoa, in *Methods in Enzymology*, Ed. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Acad. Press, N. Y., 1956, vol. I, p. 735.
7. R. G. Wolfe, J. B. Neilands, J. Biol. Chem., *221*, 61 (1956).
8. C. J. R. Thorne, Biochim. Biophys. Acta, *59*, 724 (1962).
9. O. Warburg, C. H. Cristian, Biochem. Z., *310*, 384 (1941).
10. C. L. Marker, R. Müller, Proc. Nat. Acad. Sci., *45*, 730 (1959).
11. M. Şerban, D. Cotariu, St. cerc. biochim., *14*, 93 (1971).
12. C. Frieden, J. Fernandel, Sousa, J. Biol. Chem., *250*, 2106 (1975).
13. D. Davies, E. Kun, Biochem. J., *66*, 307 (1957).
14. L. Siegel, S. Englard, Biochim. Biophys. Acta, *54*, 67 (1961).
15. E. M. Gregory, F. J. Yost Jr., M. S. Pohrbach, J. H. Harrison, J. Biol. Chem., *246*, 5491 (1971).
16. R. J. Seguin, G. W. Kosicki, Canad. J. Biochem., *45*, 659 (1964)
17. N. O. Kaplan, Bact. Rev., *27*, 155 (1963).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 177–181 (1977)

ACŢIUNEA INHIBITORILOR METABOLICI ASUPRA ACIZILOR NUCLEICI DIN FRUNZELE DE PORUMB

CONSTANŢA MUŞOLAN

Rezumat. — S-a urmărit acţiunea cloramfenicolului, fluorurii de sodiu şi arsenitului de sodiu asupra acizilor nucleici din frunze de porumb. În acest scop au fost analizaţi cantitativ şi calitativ (gelfiltrare pe Biogel P-100, electroforeză în agaroză 1,5%) acizii nucleici din sucurile stoarse la 150 atm din frunzele de porumb tratate. Inhibitorii metabolici au un efect specific de creştere a cantităţii de apă şi acizilor nucleici liberi, ce poate fi explicat prin acţiunea lor de destrămare parţială a biostructurii.

Teoria biostructurii consideră că inhibitorii metabolici provoacă o destrămare parţială a biostructurii, cu eliberarea unor componente, ca urmare a scăderii aportului de energie celulară, necesară menţinerii integrităţii biostructurii (1).

O serie de cercetări au adus dovezi experimentale în sprijinul acestei ipoteze. Astfel s-a arătat că dinitrofenolul 10^{-3} sau azida de sodiu 10^{-2} M provoacă eliberarea din biostructura frunzelor de porumb a unor anumite cantităţi de apă şi substanţe hidrosolubile, ca ionii de potasiu, sodiu, calciu, fosfat (2). Proporţia de apă liberă faţă de apa totală era mai mare în frunzele tratate cu inhibitori, decît în cele netratate (3). Frunzele infiltrate cu DNP 10^{-3} M, respectiv, NaN_3 10^{-2} M aveau o viteză de evaporare mai mică (deci o concentraţie mai mare) decît cele martor, sau cele infiltrate cu zaharoză sau alanină (4). Un fenomen interesant a fost semnalat în legătură cu acţiunea „în trepte" a azidei de sodiu asupra biostructurii frunzelor de porumb : în domenii de concentraţii foarte mari inhibitorul provoacă eliberarea din biostructură a aceleiaşi cantităţi de apă, respectiv alte componente (5). Acest fapt a fost explicat prin existenţa în biostructură a unor „linii de clivaj", între care trecerea se face discontinuu (6).

Dovezi similare au fost aduse şi prin studii de rezonanţă magnetică nucleară şi ecou de spin privind acţiunea dinitrofenolului asupra apei din nervi de broască (7) (8).

Noi ne-am propus să urmărim acţiunea unor inhibitori metabolici (cloramfenicol, fluorură de sodiu, arsenit de sodiu) asupra acizilor nucleici din frunzele de porumb, cu scopul de a verifica ipoteza biostructurală în cazul particular al acestor compuşi, de importanţă specială pentru celula vie. Ne-au interesat atît aspectele cantitative, cît şi diferenţele calitative ale acţiunii inhibitorilor metabolici asupra diferitelor forme moleculare de acizi nucleici.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit plantele de porumb hibrid simplu HS 304, crescute în lumină artificială. Plantulele s-au recoltat la 10–12 zile de la semănare.

50 g plantule de porumb se introduceau cu tulpinile în soluţii apoase de inhibitori metabolici (cloramfenicol 0,4%; fluorură de sodiu 0,1% şi arsenit de sodiu 10%), respectiv în apă

distilată, soluții de zaharoză 10^{-2} M și alanină 10^{-2} M. După 24 ore la temperatura camerei plantulele se scoteau din soluții, se spălau cu apă, se tamponau cu hîrtie de filtru.

Acțiunea inhibitorilor metabolici s-a urmărit prin stoarcerea frunzelor tratate și analiza calitativă a sucului obținut. Metoda se bazează pe premisa conform căreia inhibitorii metabolici provoacă destrămarea parțială a biostructurii, cu eliberarea unor componente care se adaugă la substanțele aflate în stare liberă în celule. Aceste componente se pot obține prin stoarcerea materialului tratat. Stoarcerea frunzelor s-a făcut cu o presă hidraulică Hafico (R.F.G.) la o presiune de 150 atm (manometru), respectiv 7 atm (probă), timp de 10 min.

Sucurile obținute se centrifugau la rece, la 1500 rpm iar supernatantul era folosit în investigațiile ulterioare.

Dozarea acizilor nucleici s-a făcut după metoda Ogur-Rosen (9) modificată (10); acizii nucleici s-au dozat spectrofotometric la 260 nm, cu ajutorul unei curbe etalon trasată pentru un amestec de ADN (spermă de hering) și ARN (drojdie) (1 :1).

Dozarea acizilor nucleici s-a făcut cu dietil-pirocarbonat-dodecilsulfat de sodiu (DEP—SDS), după Solymossy și col (11).

Gelfiltrarea pe Biogel P-100 s-a făcut pe coloane (60 × 1,5 cm), cu o viteză de eluție de 20 ml/oră, folosind Tris-HCl pH 7,4, 0,05 M; $MgCl_2$ 5 mM.

Electroforeza în gel de agazoză 1,5% s-a făcut după Vasu (12).

REZULTATE

Volumele de apă și cantitățile, respectiv concentrațiile acizilor nucleici în sucurile stoarse din 100 g frunze de porumb tratate cu inhibitori metabolici sînt date în tabela 1. Excesul de apă și acizi nucleici în sucul stors din frunzele tratate cu inhibitori față de martor sînt, conform teoriei biostructurii, de origine biostructurală, formînd o fracțiune plasmatică, alături de sucul vacuolar. Volumul de apă și cantitatea, respectiv concentrația acizilor nucleici în fracția plamatică se pot calcula, presupunînd că volumul de apă, respectiv cantitatea de acizi nucleici din sucul vacuolar este aproximativ aceeași, atît în proba martor cît și în cele tratate (tabela 2).

Tabela 1

Volumele de apă și cantitățile, respectiv concentrațiile acizilor nucleici în sucurile stoarse din 50 g frunze de porumb tratate cu inhibitori metabolici, respectiv zaharoză și alanină

Proba	Volum apă (ml)	Cantitatea AN (μg)	Concentrația AN (μg/ml)
			63
Martor	24	1 512	66
10^{-2} M zaharoză	25	1 640	67
10^{-2} M alanină	22	1 484	84
0,1% NaF	50	4 200	89
10% $NaAsO_3$	42	3 738	
0,4% cloramfenicol	42	4 242	101

Tabela 2

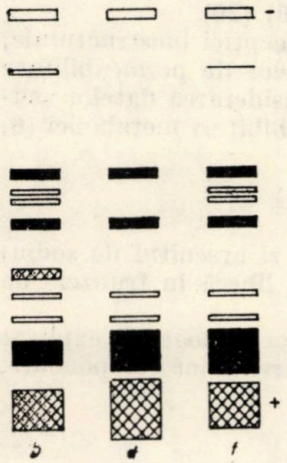
Volumul de apă, cantitățile și concentrațiile acizilor nucleici în fracția plasmatică obținută din 50 g frunze de porumb tratate cu inhibitori metabolici, zaharoză și alanină

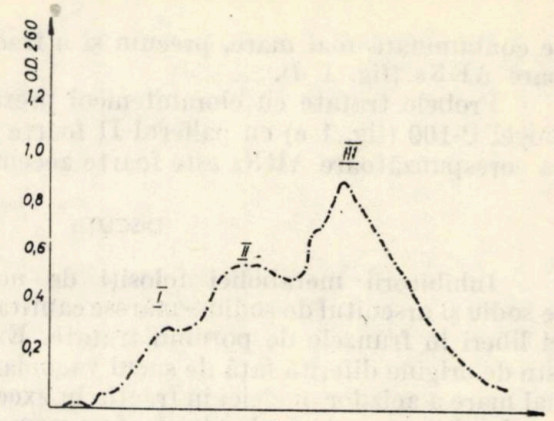
Proba	Volum suc (ml)	Cantitatea AN (μg)	Concentrația AN (μg/ml)
Martor	—	—	—
10^{-2} M zaharoză	1	—	—
10^{-2} M alanină	—	—	—
0,1% NaF	26	2 648	103
10% $NaAsO_3$	18	2 226	124
0,4% cloramfenicol	18	2 730	152

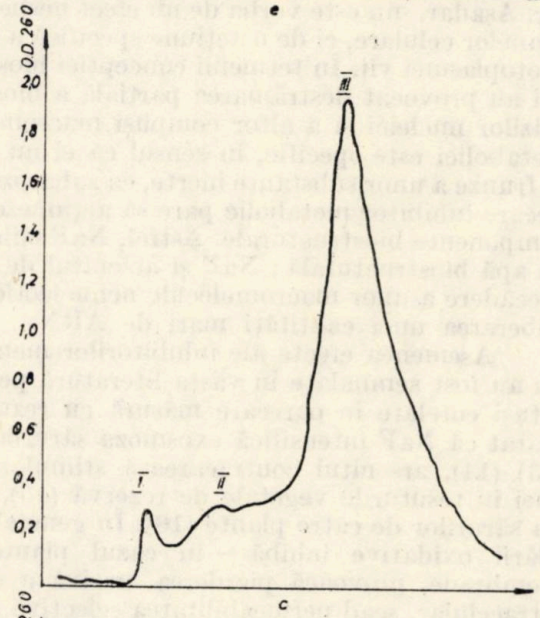
Gelfiltrarea pe Biogel P-100 a preparatului de acizi nucleici obținut din sucul stors din frunzele tratate cu NaF, respectiv Na_3AsO_3 prezintă imagini foarte asemănătoare. Curba de gelfiltrare are față de proba martor (fig. 1*a*)-piscul III mult mai accentuat, iar palierul II mai bine conturat (fig. 1 *c*). Electroforegramele evidențiază față de martor (fig. 1 *b*) o frac-

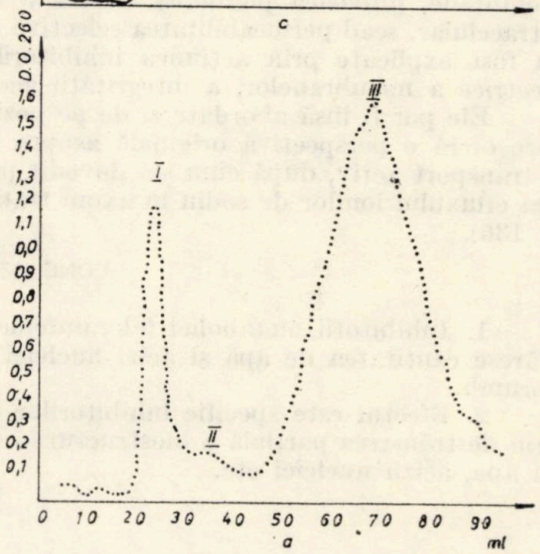
Fig. 1. — Analiza calitativă a preparatelor de acizi nucleici din sucurile stoarse din frunzele de porumb martor (*a*, *b*) respectiv tratate cu NaF şi arsenit de sodiu (*c*,*d*) şi cloramfenicol (*e*,*f*).

a, *c*, *e* gelfiltrare pe BiogelP—100
b,*d*,*f* frunzele de porumb martor (a, b), respectiv tratate cu elecztroforeză în agaroză 15%.









ție contaminată mai mare, precum și o fracție mai evidentă corespunzătoare ARNs (fig. 1 *d*).

Probele tratate cu cloramfenicol prezintă o curbă de gelfiltrare pe Biogel P-100 (fig. 1 e) cu palierul II foarte marcat. Electroforetic, fracția corespunzătoare ARNs este foarte accentuată (fig. 1 *f*).

DISCUȚII

Inhibitorii metabolici folosiți de noi — cloramfenicolul, fluorura de sodiu și arsenitul de sodiu — măresc cantitatea de apă liberă și acizi nucleici liberi în frunzele de porumb tratate. Excesul de apă și acizi nucleici este de origine diferită față de sucul vacuolar, dată fiind concentrația mult mai mare a acizilor nucleici în fracția în exces, față de cea din sucul vacuolar. Așadar, nu este vorba de un efect nespecific de permeabilizare a membranelor celulare, ci de o acțiune specifică a inhibitorilor metabolici asupra protoplasmei vii. În termenii concepției biostructurale, inhibitorii metabolici au provocat destrămarea parțială a biostructurii, cu eliberarea apei, acizilor nucleici și a altor compuși macromoleculari. Efectul inhibitorilor metabolici este specific, în sensul că el nu este provocat de pătrunderea în frunze a unor substanțe inerte, ca zaharoza sau alanina. Pe de altă parte, fiecare inhibitor metabolic pare să acționeze specific asupra unor anumite componente biostructurale. Astfel, NaF eliberează cea mai mare cantitate de apă biostructurală ; NaF și arsenitul de sodiu determină eliberarea cu precădere a unor macromolecule nenucleotidice ; cloramfenicolul provoacă eliberarea unei cantități mari de ARNs.

Asemenea efecte ale inhibitorilor metabolici asupra acizilor nucleici nu au fost semnalate în vasta literatură pe această temă. Ele ar putea fi totuși corelate în oarecare măsură cu rezultatele experimentale care au arătat că NaF intensifică exosmoza sărurilor și a altor substanțe solubile (13) (14), arsenitul contracarează stimularea indusă de IAA a reținerii apei în țesuturile vegetale de rezervă (15), cloramfenicolul inhibă absorția sărurilor de către plante (16). În general, se pare că decuplanții fosforilării oxidative inhibă — în cazul plantelor — transportul activ prin membrane, provoacă pierderea masivă a diverșilor compuși din spațiul intracelular, scad permeabilitatea selectivă față de apă (18). Aceste efecte au fost explicate prin acțiunea inhibitorilor metabolici asupra sarcinii electrice a membranelor, a integrității acestora (19) (20).

Ele pot fi însă abordate și de pe pozițiile concepției biostructurale, care oferă o perspectivă originală asupra problemelor de permeabilitate și transport activ, după cum s-a dovedit prin reconsiderarea datelor asupra efluxului ionilor de sodiu în axoni tratați cu inhibitori metabolici (6, p. 136).

CONCLUZII

1. Inhibitorii metabolici (cloramfenicol, NaF și arsenitul de sodiu) măresc cantitatea de apă și acizi nucleici în stare liberă în frunzele de porumb.

2. Efectul este specific inhibitorilor metabolici și poate fi explicat prin destrămarea parțială a biostructurii, cu eliberarea unor componente, ca apa, acizii nucleici etc.

3. NaF determină eliberarea celei mai mari cantități de apă; NaF și arsenitul eliberează compuși macromoleculari nenucleotidici; cloramfenicolul determină eliberarea celei mai mari cantități de ARNs.

4. Rezultatele noastre ar putea fi oarecum corelate cu cercetări care au semnalat diferite efecte ale inhibitorilor metabolici asupra țesuturilor vegetale.

Prezentat la redacție
5 mai, 1977

Institutul de Științe Biologice
București

THE ACTION OF METABOLIC INHIBITORS ON NUCLEIC ACIDS IN MAIZE LEAVES

(SUMMARY)

The action of chloramphenicol, sodium fluoride and sodium arsenite was tested upon the nucleic acids in maize leaves. For this purpose, the nucleic acids in the saps pressed out at 150 atm from treated leaves were quantitatively and qualitatively (Biogel P-100 gel filtration and 1,5% agarose electrophoresis) assayed. The metabolic inhibitors show a specific effect of increasing the amount of free water and nucleic acids. That may be explained by their action to provoke a partial breakdown of the biostructure.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, *Natura și structura materiei vii*, Ed. Academiei R.S.R., București, 1972, p. 78.
2. E. Macovschi, V. Frunzeti, St. Cerc. Biochim., **12**, 19 (1969).
3. C. Rabega, R. Stănescu, în : E. Macovschi *Natura și structura materiei vii*; Ed. Academiei R.S.R., București, 1972, p. 81.
4. E. Macovschi, M. Rabega, St. Cerc. Biochim. **13**, 219 (1970).
5. V. Elefterescu, St. Cerc. Biochim., **13**, 261 (1970).
6. E. Macovschi, *Biostructura*, Ed. Academiei R.S.R., București 1969, p. 69.
7. E. Macovschi, F. Mosora, Rev. Roum. Biochim., **8**, 97 (1971).
8. F. Mosora, Rev. Roum. Biochim., **9**, 51 (1971).
9. M. Ogur, G. Rosen, Arch. biochem., **25**, 262 (1950).
10. C. Mușolan, St. Cerc. Biochim., **13**, 301 (1970).
11. F. Solymossy, I. Fedorcsak, A. Gulyas, G. L. Farkas, L. Ehrenberg, Eur. Jour. Biochem., **5**, 520 (1968).
12. S. Vasu, Rev. Roum. Biochim., **6**, 75 (1969).
13. H. Lundegardh, Nature, **169**, 1088 (1952).
14. H. Lundegardh, Nature, **173**, 939 (1954).
15. D. P. Hakett, K. W. Thimann, Amer. Jour. Bot., **40**, 183 (1953).
16. R. L. Uhler, R. S. Russel, Jour. Exptl. Botanay, **14**, 431 (1963).
17. J. F. Sutcliffe, în : *Ion transport in plants*, editor W. P. Andersson, Academic Press, 1973, p. 399.
18. R. L. Bieleski, Australian Jour. Biol. Sci., **13**, 221 (1960).
19. Z. Glinka, L. Reinhold, Plant Physiol., **49**, 602 (1972).
20. D. M. Stuart, Plant Physiol., **51**, 485 (1973).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 183—187, (1977)

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTE INFERIOARE II. PIGMENŢII CAROTENOIDICI ŞI CLOROFILIENI DIN ALGE MARINE

G. NEAMŢU*, E. KOCSIS*, M. T. GOMOIU**

Rezumat. — S-au cercetat pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din algele *Cystoseira barbata*, *Ceramium elegans* şi *Laurencia caspica*, recoltate din Marea Neagră. Dintre pigmenţii carotenoidici s-au identificat în toate speciile α şi β-carotină, flavocrom, β-criptoxantină, luteină, zeaxantină, flavoxantină şi violaxantină. Pe lîngă aceşti pigmenţi în *Cystoseira barbata* s-au mai identificat fucoxantina, care este pigmentul principal, cu importanţă chemotaxonomică pentru algele brune, neofucoxantina şi neoxantina. În *Ceramium elegans* s-a găsit în plus α-criptoxantina, iar în *Laurencia caspica* euglenona.
Raportul dintre conţinutul zeaxantinei şi al luteinei este supraunitar, invers decît în ţesuturile verzi ale plantelor superioare, ceea ce poate constitui un criteriu chemotaxonomic.
Dintre pigmenţii clorofilieni s-au identificat clorofila a în toate speciile, clorofila c în *Cystoseira barbata* şi colorofila d în *Ceramium elegans* şi *Laurencia caspica*.

Algele marine sînt plante inferioare extrem de importante pentru viaţa animalelor acvatice. Ele servesc ca hrană pentru numeroase animale ce trăiesc în mări şi oceane şi contribuie într-o proporţie însemnată la oxigenarea şi depoluarea apelor. Unele specii sînt utilizate în alimentaţia omului şi a animalelor terestre (1, 2, 3, 4).

Algele marine au un conţinut ridicat în protide, glucide, vitamine, substanţe minerale, pigmenţi etc., fapt pentru care ele reprezintă o importantă rezervă de materii prime pentru industria alimentară, industria chimică, industria farmaceutică şi chiar pentru obţinerea de substanţe antibiotice, substanţe cosmetice şi îngrăşăminte agricole (1-3, 5-7).

Algele din Marea Neagră cu toate că sînt numeroase şi variate sub aspect taxonomic (alge verzi, alge albastre, alge brune şi alge roşii) sînt foarte puţin cercetate sub aspectul compoziţiei chimice (1-2,7). Nu s-a întreprins pînă în prezent un studiu chemotaxonomic asupra pigmenţilor carotenoidici din algele ce trăiesc în Marea Neagră. Determinarea conţinutului diferiţilor compuşi chimici din alge se impune ca o necesitate, pentru a se putea realiza valorificarea superioară a acestor plante.

În această lucrare se prezintă pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din alga brună *Cystoseira barbata* şi din algele roşii *Ceramium elegans* şi *Laurencia caspica*.

MATERIAL ŞI METODE

Algele Cystoseira barbata, *Ceramium elegans* şi *Laurencia caspica* au fost recoltate din Marea Neagră, în lunile septembrie — octombrie 1976, la o distanţă de 0-200 m de litoralul românesc, între Staţiunea de

Cercetări Agigea și localitatea Vama Veche. După recoltare algele s-au sortat, s-au pus în borcane mari de sticlă în alcool metilic 70% și s-au păstrat la rece și la întuneric pînă în lunile februarie și martie 1977, cînd s-au efectuat analizele chimice.

Extragerea pigmenților s-a făcut cu acetonă, pînă ce extractul a rămas incolor. Din extractul acetonic pigmenții au fost transferați ulterior în eter de petrol. Transferul pigmenților s-a făcut într-o pîlnie de separare, prin spălarea extractului acetonic cu apă, în prezența eterului de petrol. Acetona s-a dizolvat în apă și a format stratul hipofazic incolor, iar pigmenții s-au dizolvat în eterul de petrol și au format stratul epifazic colorat. După îndepărtarea stratului hipofazic soluția de pigmenți din stratul epifazic s-a spălat cu apă de 25-30 de ori, apoi pentru uscare s-a filtrat printr-un strat de sulfat de sodiu anhidru. Pentru separarea și purificarea pigmenților s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu și nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Coloanele cromatografice s-au developat cu un amestec de eter de petrol — benzen — acetonă, în raport de 7 : 2 : 1. Pentru verificarea purității pigmenților și pentru cromatograme de amestec s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizînd ca adsorbant oxid de magneziu și silicagel, în raport de 2 :1 în volum, iar ca developant etanol-cloroform-eter de petrol, în raport de 2 :1 :7.

Identificarea și determinarea pigmenților carotenoidici s-a făcut prin metode cromatografice, spectroscopice și colorimetrice, la fel ca și în lucrările anterioare (8, 9, 10).

Pigmenții clorofilieni s-au determinat după metoda prezentată de I. Maróti și Eva Gabnai (11).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici și al celor clorofilieni din algele cercetate, care reprezintă media a trei determinări, se prezintă în tabela 1.

Pigmenții carotenoidici și cei clorofilieni sînt trecuți în tabel în ordinea descrescîndă a adsorbției lor pe coloana cromatografică.

Algele cercetate, spre deosebire de frunzele verzi ale plantelor superioare (5, 6, 12, 13, 14), au un conținut mai ridicat și mai variat în pigmenți carotenoidici.

Dintre pigmenții carotenoidici identificați, care se găsesc în toate cele trei specii cercetate, un conținut mai ridicat au β-carotina, zeaxantina, luteina și β-criptoxantina, iar un conținut mai scăzut au α-carotina, flavocromul, flavoxantina și violaxantina. În *Cystoseira barbata*, pe lîngă pigmenții carotenoidici menționați anterior se mai găsesc fucoxantina, care este pigmentul principal, de culoare brună, cu importanță chemotaxonomică pentru algele brune (4,6, 16), neofucoxantina și neoxantina. În *Ceramium elegans* se găsește în plus α-criptoxantina, iar în *Laurencia caspica* s-a identificat în cantitate mică euglenona.

Pigmenții carotenoidici din algele cercetate după compoziția chimică și după grupările funcționale ce le conțin pot fi repartizați în următoarele cinci grupe :

Carotenoide hidrocarburice (α și β-carotină)

Xantofile (α şi β-criptoxantină, luteină, zeaxantină)
Epoxizi (violaxantină, neoxantină, neofucoxantină, fucoxantină),
Furanoizi (flavocrom, flavoxantină)
Carotenoide cetonice (euglenonă)

Tabela 1

Pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din *Cystoseria barbata*, *Ceramium elegans*, *Laurencia Caspica*, în μg/g material

Pigmenţi	Cystoseira barbata	Ceramium elegans	Laurencia caspica
a. *Pigmenţi carotenoidici*			
Fucoxantină	74,6	—	—
Neofucoxantină	19,6	—	—
Neoxantină	1,8	—	—
Violaxantină	2,0	8,4	3,3
Flavoxantină	3,0	3,6	1,6
Zeaxantină	12,2	49,7	20,6
Luteină	5,3	24,7	4,9
β-criptoxantină	4,8	16,6	9,0
α-criptoxantină	—	10,0	—
Euglenonă	0,9	6,3	3,5
β-carotină	40,5	59,9	44,7
α-carotină	2,3	27,2	2,5
b. *Pigmenţi clorofilieni*			
Clorofilă d	—	11,8	17,8
Clorofilă c	30,2	—	—
Clorofilă a	58,4	64,1	47,2

Raportul dintre conţinutul zeaxantinei şi al luteinei este supraunitar, invers decît în ţesuturile verzi ale plantelor superioare (5,6, 12-14), ceea ce poate constitui un criteriu chemotaxonomic pentru algele cercetate. De asemenea apare ca un aspect caracteristic prezenţa carotenoidelor furanoidice (flavocrom, flavoxantină), care se găsesc foarte rar în ţesuturile verzi ale plantelor terestre.

În plantele cercetate s-au identificat numai carotenoide cu structură α şi β-iononică. Nu s-au identificat carotenoide cu structură γ-iononică şi aciclică. Sub aspect cantitativ predomină carotenoidele cu structură β-iononică.

Dintre carotenoidele provitaminice (α şi β-carotina, euglenona, α şi β-criptoxantina) în cantitate mai mare se află β-carotina, ceea ce ridică valoarea algelor ca surse importante de provitamine A.

Prin faptul că algele cercetate au un conţinut ridicat în pigmenţi carotenoidici ele ar putea fi utilizate în hrana păsărilor, ca surse de pigmenţi carotenoidici, pentru intensificarea culorii corpului şi a gălbenuşelor ouălor.

Pigmenţii clorofilieni au un conţinut relativ scăzut şi sînt puţin diversificaţi. Dintre clorofile s-au identificat clorofila a în toate speciile, clorofila c în *Cystoseira barbata* şi clorofila d în *Ceramium elegans* şi *Laurencia caspica*.

Clorofilele c și d au importanță chemotaxonomică pentru diferite grupe de plante. Clorofila c este caracteristică pentru algele brune, diatomee și dinoflagelate, iar clorofila d pentru algele roșii (6,15—17).

CONCLUZII

1. Plantele cercetate au un conținut ridicat și variat în pigmenți carotenoidici și mai puțin în pigmenți clorofilieni.
2. Dintre pigmenții carotenoidici identificați, în cantitate mai mare se află în toate speciile, β-carotina, zeaxantina, luteina și β-criptoxantina, iar în cantitate mai mică α-criptoxantina, flavocromul, flavoxantina și violaxantina. Pe lîngă aceste carotenoide în *Cystoseira barbata* se mai găsește fucoxantina, neofucoxantina și neoxantina, în *Ceramium elegans* α-criptoxantina, iar în *Laurencia caspica* euglenona.
3. În plantele cercetate s-au identificat numai carotenoide cu structură α și β-iononică.
4. Pigmenții clorofilieni sînt mai puțin diversificați și au un conținut relativ scăzut.

Prezentat la redacție
la 24 martie 1977

* *Institutul agronomic „Dr. Petru Groza" din Cluj-Napoca*
Disciplina de Chimie și Biochimie vegetală
** *Institutul român de cercetări marine Constanța*
Stațiunea de Cercetări Agigea

CHEMOTAXONOMIC RESEARCHES IN LOWER PLANTS
II. CAROTENOID AND CHLOROPHYLL PIGMENTS IN SEA ALGAE

(SUMMARY)

Investigations were carried out on the carotenoid and chlorophyll pigments in algae *Cystoseira barbata*, *Ceramium elegans* and *Laurencia caspica*, gathered from the Black Sea.

Amongs the carotenoid pigments, there were identified in all the species, α- and β-carotene, flavochrome, β-cryptoxanthin, lutein, zeaxanthin, flavoxanthin and violaxanthin. Besides the said pigments, in *Cystoseira barbata* there were also identified : fucoxanthin, — which was the principal pigment having a chemotaxonomic importance for the brown algae, neofucoxanthin and neoxanthin. In addition, in *Ceramium elegans* there was found also α-cryptoxanthin, while in *Laurencia caspica*, euglenone.

The supraunitary ratio between the content of zeaxanthin and lutein — conversely of the green tissues of higher plants— might be used also as a chemotaxonomic criterion.

Amongs the chlorophyll pigments, there were identified as follows : chlorophyll a in all species, chlorophyll c in *Cystoseira barbata* and chlorophyll d in *Ceramium elegans* and *Laurencia caspica*.

BIBLIOGRAFIE

1. Cr. Simionescu, V. Rusan, V. Popa, *Chimia algelor marine*, Edit. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1974, p. 62.
2. Al. Ionescu, Fl. Vasiliu, A. Bavaru, V. Olimid, *Algele şi utilizarea lor*, Citat din *Tratat de algologie* Red. de St. Péterfi şi Al. Ionescu, Edit. Acad. R. S. România, vol. 1, 1976, p. 501.
3. A. Radu, *Botanică sistematică*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1974, p. 324.
4. T. W. Goodwin, *Stravitelnaia Biohimia Karotinoidov*, Izdatelistvo Inostranoi Literaturi, Moscova, 1954, p. 150.
5. A.S. Holt, Citat din *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (Ed. T.W. Goodwin), Acad. Press. London and New York, 1965, p. 3.
6. T.W. Goodwin, Citat din *Comparative Phytochemistry*, (Ed. T. Swain), Acad. Press. London and New York, 1966, 121, 123.
7. I. Hodişan, I. Pop, *Botanică sistematică*, Edit. didactică şi pedagogică, Bucureşti, 1976, p. 76.
8. Gh. Illyes, G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **18**, 109 (1975).
9. G. Neamţu, C. Bilaus, T. Laszlo, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976).
10. G. Neamţu, T. Laszlo, C. Bilaus, Gh. Illyes, St. cerc. biochim., **19**, 81 (1976).
11. I. Maröti, E. Gabnai, Acta Biol. Szeged, **17**, 67 (1971).
12. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **17**, 41 (1974).
13. G. Neamţu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **16**, 171 (1973).
14. C. Costes, Ann. Physiol. Vég., **10**, 171 (1968).
15. A. Hager, H. Stransky, Arch. Microbiol., **73**, 77 (1970).
16. H.H. Strain, Citat din *Biochemistry of Chloroplasts*, Ed. T. W. Goodwin, Acad. Press. London and New York, 1966, p. 387.
17. S.W. Jeffery, Biochem. J., **80**, 336 (1961).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 189—195, (1977.

MODIFICĂRILE METABOLISMULUI PURINELOR DUPĂ IRADIERE EXPERIMENTALĂ ŞI TERAPEUTICĂ

STELA NIŢĂ, RADU OLINESCU, GHEORGHE CIOBA, CONSTANTIN PĂUN

Rezumat. — În urma iradierii experimentale a diferitelor specii de animale (şobolani, cîini, porci) s-a observat o creştere semnificativă a activităţii xantinoxidazei plasmatice în prima şi mai ales în ziua a şaptea, mai evidentă la doze mari. La şobolani, X.O. din ficat creşte continuu pînă în ziua şaptea, după care tinde să scadă. Acidul uric plasmatic creşte semnificativ doar la doze mari. La pacienţi, iradiaţi terapeutic şi mai ales la cei cu tratament chimioterapic, X.O. variază invers proporţional cu numărul leucocitelor.

Iradierea organismelor, mai ales cu doze letale, produce o serie de modificări biochimice printre care degradarea acizilor nucleici şi apariţia în concentraţii mari în sînge a produşilor acestei degradări. În timp ce bazele pirimidinice şi chiar desoxiriboza au fost mult studiate (1—5), creşterea lor fiind, în anumite limite, proporţională cu doza de iradiere, purinele au fost aproape de loc cercetate. De abia recent, necesităţile terapiei complexe au impus studiul metabolismului purinelor, mai ales în stări hiperuremice de diferite origini (6,7).

Xantinoxidaza (xantin-oxigen oxidoreductază, E.C. 1.2.3.2.) catalizează reacţiile finale (la om) ale catabolismului purinelor, de trecere a hipoxantinei în xantină şi oxidarea acesteia în acid uric. Această enzimă, puţin studiată clinic, se remarcă printr-o compoziţie complexă (Fe, Mo, FAD), specificitate mică de substrat, forme moleculare multiple, fiind implicată şi în metabolismul altor compuşi (pteridine, tioli etc.) (8—10).

Studierea variaţiilor xantinoxidazei (X. O.) şi acidului uric în urma iradierii organismelor poate furniza informaţii metabolismului purinelor în general şi eventuala aplicare în clinică.

MATERIAL ŞI METODE

Animale de experienţă (şobolani Wistar de 150±10 g, cîini Beagle 10± 2 kg şi porc 40±5 kg) au fost iradiate cu diferite doze de radiaţii gamma folosind un Cobaltron Chisobalt 75 (Praga), 3 000 Ci. Loturile de porci şi cîini au fost compuse din 4 animale pentru fiecare doză, fiecare animal fiind propriul lui martor. Loturile de şobolani au cuprins cîte 10 animale.

Activitatea xantinoxidazei plasmatice s-a determinat după metoda Kalckar (11) modificată, din ficat după Hashimoto (12), iar acidul uric după Heilmeyer (13). Activitatea X.O. este exprimată în μmoli acid uric formaţi /h.

REZULTATE

Xantinoxidaza este o enzimă intracelulară, aşa încît la animale şi la om, în condiţii fiziologice, în plasmă, activitatea enzimatică este foarte mică sau nulă, crescînd doar în insuficienţă hepatică (14). Într-o primă

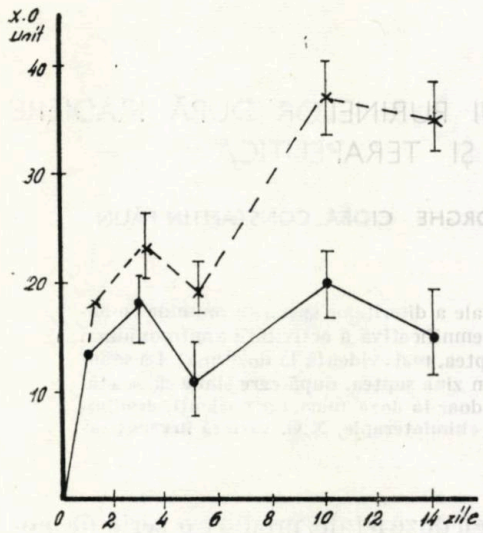


Fig. 1. — Modificările activității xantinoxidazei plasmatice la porci iradiați cu 200(—) și 360 Rads (— — —).

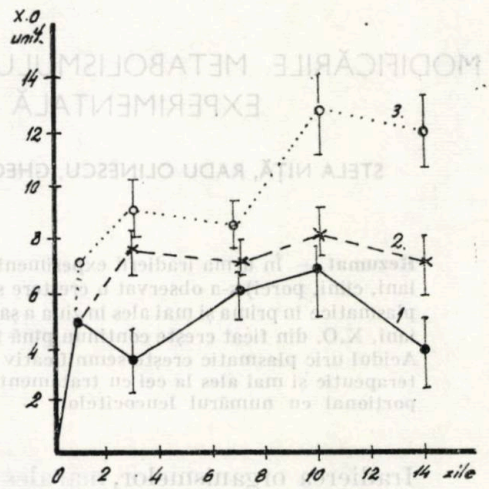


Fig. 2. — Modificările activității xantinoxidazei plasmatice la cîini iradiați cu 200 (—) (1), 600 (— — —) (2) și 1 000 Rads (...) (3)

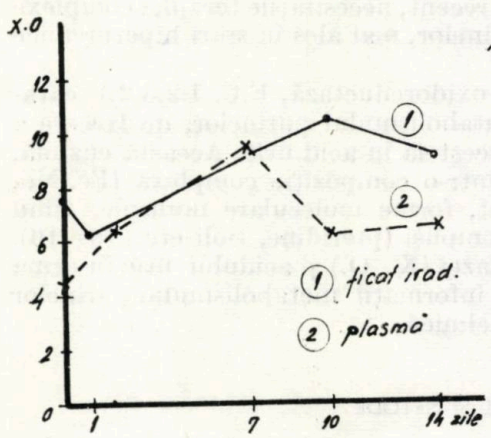


Fig. 3. — Modificările activității xantinoxidazei din ficat (—) (1) și plasmă (— — —) (2) la șobolani iradiați cu 700 Rads.

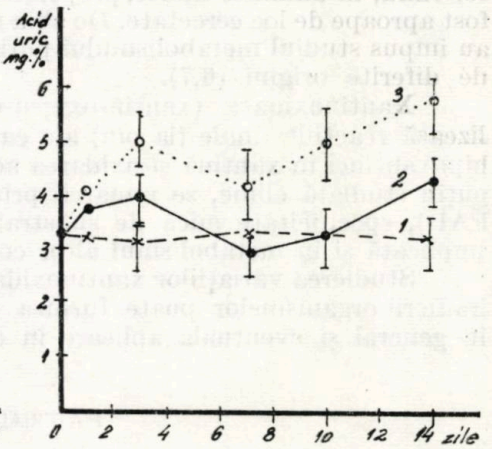


Fig. 4. — Variațiile acidului uric plasmatic la cîini iradiați cu 200 (— —) (1) 600 (———) (2) și 1 000 Rads (...) (3).

etapă, am urmărit variațiile activității X.O. și acidului uric în urma iradierii experimentale cu diferite doze la diferite specii de animale.

Din figurile 1—3 se observă că la toate cele trei specii de animale, activitatea X.O. crește mai ales între 7 și 10 zile de la iradiere, dar se poate remarca și un prim maxim, de intensitate mai mică după prima zi. De asemenea, această creștere este mai evidentă cu cît doza de iradiere este mai mare. La cîini și porci, activitatea enzimei, indiferent de doză rămîne crescută pînă la exitus sau timp de două săptămîni în cazul dozelor sub-

letale. Valorile determinării acidului uric nu prezintă modificări semnificative decît în cazul dozelor letale (fig. 4)

În ficat, determinarea activității X.O. efectuată doar la șobolan permite observarea unei creșteri continue cu maxim la a șaptea zi de la iradiere (fig. 3), după care urmează o tendință de scădere către valorile inițiale. Creșterea activității X.O. în ficat poate fi datorată eliberării purinelor și captării lor de către acest organ. Rowe (15) a arătat că nivelul X.O. din ficat poate fi crescut prin administrare de acid ribonucleic sau purine, ca și orice enzimă inductibilă. Ținînd seama de un anumit grad de radiorezistență al ficatului, probabil că în urma iradierii ficatul captează purine (ca și alți produși) eliberate în alte țesuturi mai radiosensibile. Oricum, studiul modificărilor activității xantinoxidazei și a acidului uric a arătat o creștere semnificativă doar la doze letale, cu o sensibilitate mai mare, la toate speciile a xantinoxidazei.

Datele obținute în iradierea experimentală, rezumate în concluziile de mai sus, ne-au determinat să urmărim aceiași parametri și la om, în iradiere terapeutică. O primă serie de rezultate au fost obținute urmărind variația acestor parametri la pacienți beneficiind doar de iradiere, concretizat în exemplul din figura 5.

După cum se observă din figura 5, la pacienții iradiați terapeutic se constată o creștere semnificativă a activității xantinoxidazei după 4—6 000 Rads/T doză acumulată. Acidul uric nu variază semnificativ, iar numărul de leucocite tinde să scadă, pe măsura creșterii activității enzimei. Această ultimă tendință devine mult mai evidentă în cazul unui tratament cu citostatice de tip ciclofosfamidă, din care prezentăm un exemplu în figura 6. Acest raport invers între scăderea numărului de leucocite și creșterea activității xantinoxidazei plasmatice s-a observat în număr mare de cazuri chiar cu tratament asociat radio și chimioterapie. Acest fapt experimetal a fost confirmat și în urma unui experiment pe animale (șobolani și cîini) ce va fi publicat ulterior. Oricum, această relație între creșterea activității X.O. și scăderea numărului de leucocite nu a mai fost semnalată în literatura de specialitate. După toate probabilitățile, sursa xantinoxidazei din plasmă ar putea fi constituită din leucocitele distruse de acțiunea citostaticului. În acest caz ar trebui să crească și acidul uric plasmatic ceeace se întîmplă, dar într-o măsură mai mică ținînd seama de variațiile celorlalți doi parametri. Eliminarea acidului uric pe cale renală crește însă, dar nu atît de mult cît ne-am fi așteptat.

Creșterea activității xantinoxidazei, atît în urma iradierii experimentale sau terapeutice are drept consecință o formare mărită de acid uric, fapt confirmat și de alți autori (5,16). Un studiu mai aprofundat al creșterii catabolismului purinelor ca urmare a unui tratament complex radio-chimioterapic este complicat însă de faptul că la om, produsul final, acidul uric, este puțin solubil. Pe cînd la celelalte mamifere acidul uric este transformat de uricază în alantoină, de 5 ori mai solubilă, la om acest compus este eliminat renal. Aproximativ 6—7 mg acid uric/minut este filtrat prin glomerului și majoritatea este reabsorbită și reciclizată (6,16).

Căutînd să studiem cinetica reacției de formare a acidului uric în plasmă ne-am lovit de problema micii solubilități a acestuia (aproximativ 0,40 mg/ml), proprietate ce contribuie la depunerea lui în cazul unor

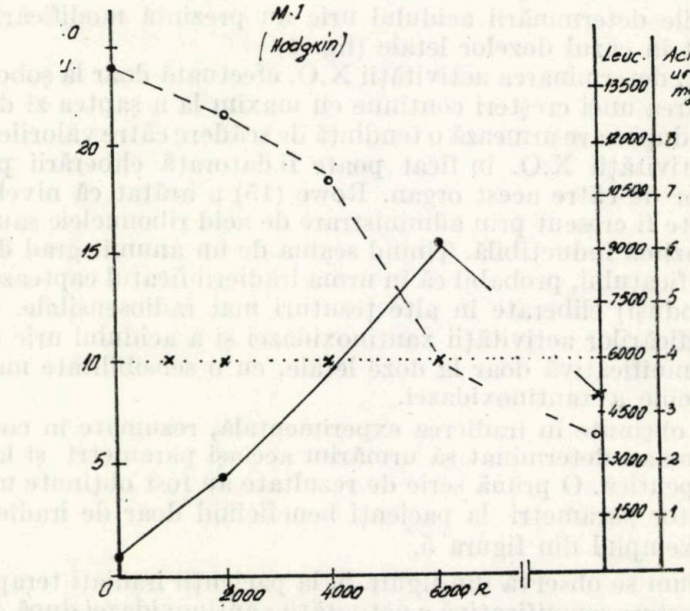


Fig. 5. — Variaţiile activităţii xantinoxidazei (—), acidului uric (. . .) plasmatic şi a numărului de leucocite (- - -) la un pacient cu boală Hodgkin în urma unui tratament radioterapic (doză cumulată).

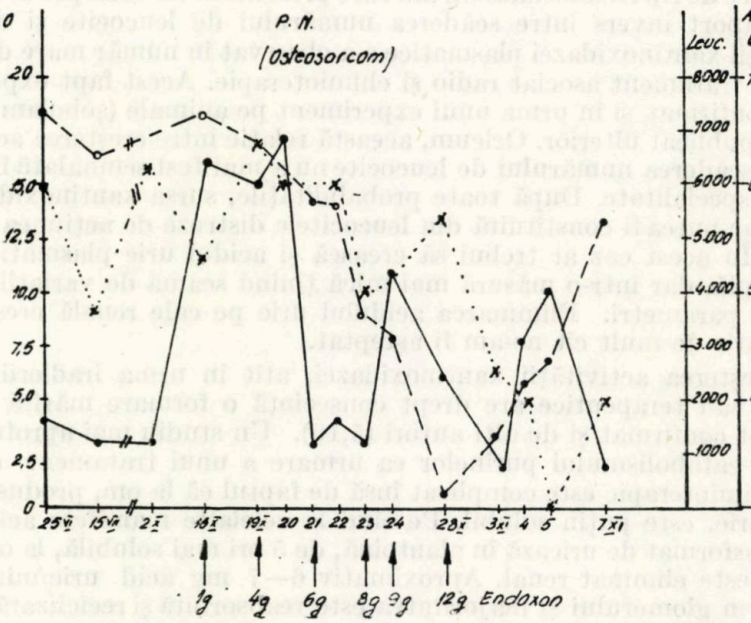


Fig. 6. — Variaţiile activităţii xantinoxidazei (—), acidului uric (. . .) plasmatic şi a numărului de leucocite (- - -) la un pacient cu osteosarcom du pă un tratament cu citostatice de tip Endoxan.,

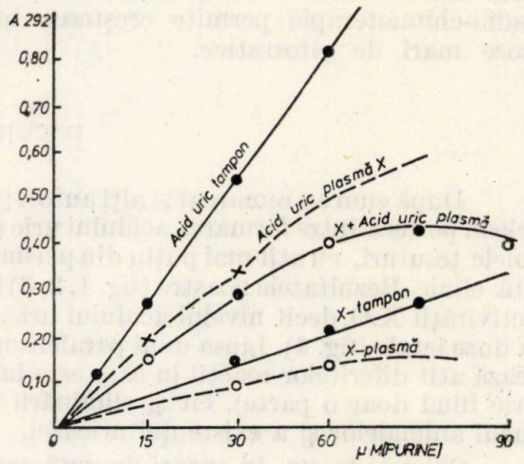


Fig. 7. — Variația absorbției la 292 nm a acidului uric și xantinei (X) în diferite concentrații, în urma disolvării lor în tampon fosfat 0,05 M pH 7,4 și în plasmă de om.

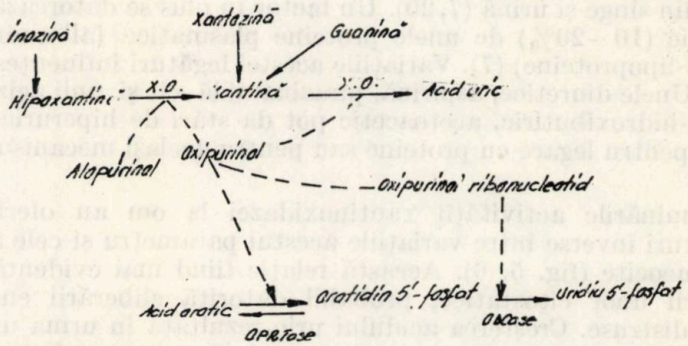


Fig. 8. — Schema acțiunii unui inhibitor de xantinoxidază (alopurinol) asupra unor reacții din metabolismul purinelor (sus) și al pirimidinelor (jos). OPRTase= orotat fofsforiboziltransferază, ODCase = orotidilat decarboxilază.

soluții saturate, atît în „vitro", cît și în „vivo". După cum se observă din figura 7, limita de saturare a acidului uric în plasmă pare să fie situată la o concentrație egală cu dublul nivelului fiziologic, de aproximativ 60/μM—12 mg%. Oricum, formarea crescută a acidului uric în hiperuricemii (gută) sau în urma tratamentului radio-chimioterapic trebuie micșorată, așa că încă de acum 10 ani s-a propus (17) folosirea unui inhibitor de xantinoxidază, cum este alopurinolul. Utilizarea lui în hiperuricemii a fost extinsă și în alte tratamente complexe, cum ar fi în neoplazii. Alopurinolul, așa cum reiese din figura 8, inhibă competitiv xantinoxidaza, dar intervine și în metabolismul pirimidinelor la nivelul orotat fosforiboziltransferazei și orotidilat decarboxilazei (18). Prin asocierea alopurinolului cu tratamentul radio-chimioterapic se produc modificări ale variațiilor xantinoxidazei, acidului uric semnalate înainte, datorită inhibării biosintezei purinelor, dar și a pirimidinelor (18—20), făcînd și mai dificilă o interpretare. Așa cum rezultă din experiența noastră prezen-

tată într-o viitoare lucrare, folosirea alopurinolului în asociere cu tratament radio-chimioterapic permite creșterea toleranței organismului uman la doze mari de citostatice.

DISCUȚII

După cum au remarcat și alți autori (10, 12) „*in vivo*" nu este un paralelism perfect între formarea acidului uric și activitatea xantinoxidazei din unele țesuturi, cu atît mai puțin din plasmă, unde enzima a fost puțin studiată clinic. Rezultatele noastre (fig. 1, 2, 3) indică o mai mare sensibilitate a activității X.O. decît nivelul acidului uric, care nu crește semnificativ decît la doze letale (fig. 4). Lipsa unui paralelism între cei doi parametri se datorează atît diferitelor reacții în care este implicată X.O. (formarea acidului uric fiind doar o parte), cît și eliminării renale, a reabsorbției lui, iar în cazul animalelor și a existenței uricazei.

Chiar și la om, în cazuri de gută sau alte stări hiperuricemice, cît și din experiența noastră, nu s-a observat un paralelism între variațiile acidului uric din sînge și urină (7, 20). Un factor în plus se datorează legăturii acidului uric (10—20%) de unele proteine plasmatice (albumină, $\alpha_1-\alpha_2$ globuline, β-lipoproteine) (7). Variațiile acestei legături influențează excreția renală. Unele diuretice, aspirină, pirazinamidă cît și unii acizi organici ca lactic, β-hidroxibutiric, acetoacetic pot da stări de hiperuricemie prin competiție pentru legare cu proteine sau pentru același mecanism secretor renal.

Determinările activității xantinoxidazei la om au oferit surpriza unor raporturi inverse între variațiile acestui parametru și cele ale numărului de leucocite (fig. 5, 6). Această relație fiind mai evidentă în cazul administrării unor citostatice, probabil datorită eliberării enzimei din leucocitele distruse. Creșterea acidului uric rezultată în urma unui tratament intensiv cu citostatice, mai ales asociată cu o insuficiență renală sau hipertiroidism impune folosirea unui inhibitor de xantinoxidază cum este alopurinolul, evitînd atît instalarea unei stări de hiperuricemie periculoase, cît și folosirea unor doze mai mari de citostatice.

Rezultatele noastre indică oportunitatea determinării activității xantinoxidazei în iradieri terapeutice, asociate mai ales cu chimioterapie, și probabil și în iradieri accidentale.

CONCLUZII

1) In urma iradierii experimentale la șobolani, cîini și porci se produce o creștere a activității xantinoxidazei plasmatice cu maxime în prima și a șaptea zi. Nivelul acidului uric crește semnificativ doar în urma iradierii cu doze letale.

2) S-au observat creșteri semnificative ale activității xantinoxidazei plasmatice și la pacienți iradiați terapeutic sau la care s-au administrat citostatice. Mai ales în ultimul caz se observă relații inverse între creșterea activității xantinoxidazei și scăderea numărului de leucocite.

3) Creşterea mare a acidului uric în urma unui tratament radiochimioterapic trebuie evitată din cauza solubilităţii mici a acestuia şi poate fi realizată prin administrarea unui inhibitor de xantinoxidază.

Prezentată la redacţie
30 septembrie 1976

Secţia de Radiobiologie
Spitalul Clinic Fundeni
Bucureşti

MODIFICATIONS OF PURINE METABOLISM FOLLOWING EXPERIMENTAL AND THERAPEUTICAL IRRADIATION

(SUMMARY)

Following experimental irradiation of various species of animals (rats, dogs, pigs), a significant increase of xanthine oxidase activity was observed in the first and especially the seventh day after irradiation, more evident as the irradiation dose was higher.

In rats, the liver xanthine oxidase increases continuously with a plateau on the 7th day, later decreases towards the initial value. Plasmatic uric acid increases significantly only at lethal doses.

In patients, irradiated therapeutically and especially those with chemicotherapical treatment, plasmatic xanthine oxidase varies in opposite way with the leucocyte counts.

BIBLIOGRAFIE

1. C. Straffer, *Strahlenbiochemie*, Springer Verlag, Heidelberg, 1969.
2. J. Parizek, M. Arient, J. Dientsbier, J. Skoda, Nature, **182**, 721 (1958).
3. C.D. Guri, K. F. Swingle, L. J. Cole. Int. J. Rad. Biol., **12**, 355 (1967).
4 M. Salle, F. Gemsicke, Int. J. Rad. Biol., **15**, 507 (1969).
5. C. Streffer, *Biochemical Indicators of Radiation Injury in Man*, Proc. Sci. Meet. IAEA, Vienna 1971, p. 15.
6. W. N. Kelley, Enzyme, **18**, 161 (1974).
7. J.B. Wyngaarden, Am. J. Medicine, **56**, 651 (1974).
8. D.M. Valerino, J. J. Mc Cormack, Biochim. Biophys. Acta, **184**, 154 (1969).
9. R. Olinescu, Rev. roum. Biochim., **8**, 303 (1971).
10. E. Della Corte, F. Stirpe, Biochem. J., **126**, 739 (1972).
11. H.M. Kalckar, J. Biol. Chem., **167**, 429 (1947).
12. S. Hashimoto, Analyt. Biochem., **62**, 426 (1974).
13. L. Heilmeyer, W. Krebs, Biochem. Z., **223**, 365 (1936).
14. S. Giler, O. Sperling, S. Brosh, A de Vries, Clin. Chim. Acta, **63**, 37 (1975).
15. P.B. Rowe, J. B. Wyngaarden, J. Biol. Chem., **241**, 5571 (1966).
16. I. H. Krakoff, R. L. Meyer, J. Am. Med. Assoc., **193**, 1 (1965).
17. R.W. Rundless, E. N. Metz, H. R. Silberman, Am. Int. Med., **64**, 229 (1966).
18. M.H. Wood, W. J. O'Sullivan, M. Wilson, Clin. Exp. Pharm. Physiol., **1**, 53(1974).
19. N.M.Hadler, W.A. Franck, D. R. Robinson, Am. J. Med., **56**, 715 (1974).
20. W. N. Kelley, Nephron, **14**, 99 (1975).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 197—201, (1977)

CAROTINOIDE DIN INSECTE III.* CAROTINOIDE DIN INSECTA *EURYDEMA ORNATA*

V. TĂMAŞ+ V. CIURDARU+, K. L. SIMPSON+, T. PERJU++

Rezumat. — Au fost cercetate carotinoidele din insectele adulte de *Eurydema ornata* comparativ cu cele din planta gazdă, *Lepidium draba*. În insecte au fost identificate aceleaşi tipuri de carotinoide ca şi în planta gazdă, dar insectele acumulează selectiv aceşti pigmenţi. Astfel β-carotina ajunge la 56% din totalul carotinoidelor în insecte faţă de 6% în plantă; în insecte n-a fost însă identificată auroxantina, prezentă în cantitate apreciabilă în plantă.

În continuare cercetărilor noastre asupra naturii carotinoidelor din insecte dăunătoare (1, 2) s-a studiat conţinutul în carotinoide al insectei *Eurydema ornata*, comparativ cu al plantei gazdă, *Lepidium draba*. Această insectă este răspîndită în Europa Centrală şi Orientală. La noi în ţară se întîlneşte pretutindeni, cu deosebire în regiunile de stepă. După hibernare, în a doua jumătate a lunii aprilie *Eurydema ornata* îşi face apariţia mai întîi în cîmp, pe diferite plante crucifere spontane, apoi în răsadniţe pe răsadurile de crucifere şi în cele din urmă pe cîmp pe culturile de crucifere proaspăt plantate. Timp de 10—25 zile insectele din generaţia hibernantă se hrănesc înţepînd şi sugînd sucul celular din organele verzi ale plantelor, în principal din frunze. Paralel cu hrănirea are loc şi ponta insectelor. În anii de înmulţire în masă produce pagube la culturile legumicole vărzoase de pînă la 50—70% (3, 4).

Dezvoltarea stadiului larvar durează 30—45 zile. Pe la jumătatea lunii iunie apar insectele adulte din noua generaţie. În sudul ţării în cursul lunilor august şi septembrie insectele se înmulţesc într-o nouă generaţie. Adulţii din prima generaţie şi larvele din cea de a doua generaţie se hrănesc pe seama frunzelor şi lăstarilor, florilor şi silicvelor plantelor semincere. Frunzele atacate se depigmentează, se deformează şi se necrozează; florile avortează, iar producţia de seminţe este redusă şi de calitate inferioară.

MATERIAL ŞI METODĂ

Insectele *Eurydema ornata* cercetate au fost insecte adulte din generaţia hibernantă, colectate de pe cruciferele spontane *Lepidium draba*.

Extracţia şi saponificarea pigmenţilor. Extractul de carotinoide, atît din insecte, cît şi din planta gazdă, a fost obţinut prin tratarea materialului proaspăt, foarte fin mărunţit, cu o soluţie de hidroxid de potasiu 15% în metanol timp de 2 ore la temperatura camerei, la întuneric

* Lucrarea face parte din Programul comun de cercetare al Institutului agronomic, Cluj-Napoca, România şi Universităţii Rhode Island, Kingston, S.U.A.

+ Pentru partea biochimică

++ Pentru partea entomologică

(2,5). Carotinoidele au fost deplasate apoi cantitativ într-un amestec de eter de petrol şi eter etilic 3 :1, prin adăugare de apă acidulată cu acid acetic. Extractul, spălat pînă la neutru cu apă distilată şi uscat peste sulfat de sodiu anhidru, s-a evaporat la sec la rotavapor, temperatura băii de apă nedepăşind 40°C. Reziduul carotinoidic s-a reluat în eter de petrol în vederea determinării conţinutului total de carotinoide şi cromatografierii.

Separarea şi purificarea pigmenţilor. Pentru separarea şi purificarea pigmenţilor s-a făcut uz de cromatografia pe strat subţire atît de MgO, cît şi de silicagel G (Woelm, neutral) neactivat. Prin developarea cromatoplăcii de silicagel cu eter de petrol s-a separat ca zonă unitară (Rf = 0,95) amestecul, de α-carotină şi β-carotină. Această zonă s-a eluat şi recromatografiat pe placă cu MgO, prin developare cu eter de petrol (Tabelele 1 şi 2) separîndu-se α-

Tabela 1

Carotinoidele din frunze de *Lepidium draba* şi unele caracteristici ale lor

Carotinoide	Culoarea zonei pe cromatoplacă	Rf	λmax. în eter de petrol (nm)	Cantitatea relativă (%)	Valoarea $E^{1\%}_{1\ cm}$	Repartiţie hipofazică între eter de petrol şi metanol 95% (în %)	Reacţia cu HCl în eter etilic
α-Carotină	galben	0,75[a]	443,469	2	2 800	—	—
β-Carotină	portocaliu	0,50[a]	448,476	6	2 505	—	—
Luteină	galben	0,32[b]	442,470	45	2 550	95	—
5,6-Epoxiluteină	galben	0,21[b]	440,470	12	2 400	95	albastru
5,8,5',8'-Diepoxizeaxantină	galben-pal	0,15[b]	378,398 424	22	1 850	95	albastru
Neoxantină	galben	0,04[b]	413,435, 463	13	2 270	95	albastru

a = pe cromatoplacă cu oxid de magneziu şi developare cu eter de petrol
b = pe cromatoplacă cu silicagel şi developare cu amestec de eter de petrol/eter etilic (1 :1)

Tabela 2

Carotinoide din insecte adulte *Eurydema ornata* şi unele caracteristici ale lor

Carotinoidă	Culoarea zonei pe cromatoplacă	Rf	λ max. în eter de petrol (în nm)	Cantitatea relativă (%)	Valoarea $E^{1\%}_{1\ cm}$	Repartiţia hipofazică între eter de petrol şi metanol 95%(în%)	Reacţia cu HCl în eter etilic
α-Carotină	galben	0,75[a]	443,469	6	2 800	—	—
β-Carotină	portocaliu	0,50[a]	448.476	56	2 505	—	—
Neidentificat	roz	0,85[b]	446	2	—	95(culoare roz	roz
Neidentificat	roz	0,75[b]	374,438	2	—	95 (culoare roz)	roz
cis-Luteină	galgen	0,61[b]	440,470	5	2 550	95	—
trans-Luteină	galben	0,40[b]	440,471	26	2 550	95	—
5,6-Epoxiluteină	galben	0,26[b]	440,467	11	2 400	95	albastru
Neidentificat	galben	0,08[b]	441,469	2	2 550	95	—
Neoxantină	galben	0,04[b]	413,435 464	5	2 270	95	albastru
Neidentificat	galben	0,02[b]	420,440, 470	2	2 550	94	—

a = pe cromatoplacă cu oxid de magneziu şi developare cu eter de petrol
b = pe cromatoplacă cu silicagel şi developare cu eter de petrol/eter etilic (1 :1)

de β-carotină. Restul pigmenților de pe cromatoplaca de silicagel, rămași aproape pe strat, s-au separat pe aceeași cromatoplacă uscată, apoi developată imediat cu un amestec de eter de petrol și éter etilic 1 :1. Zonele cu pigmenți au fost rase de pe plăci și eluate, imediat după developare. Eluarea pigmenților de pe placă s-a făcut cu eter de petrol prin adăugare de metanol și apoi apă pentru dezactivarea adsorbentului. Prin spălare cu apă de repetate ori și uscare pe sulfat de sodiu anhidru s-au obținut soluțiile în eter de petrol ale pigmenților carotinoidici separați în stare pură.

Identificarea pigmenților. Pentru identificarea carotinoidelor s-au analizat caracteristicile cromatografice, comparîndu-se cu cele ale carotinoidelor cunoscute, maximele de absorbție în vizibil cu ajutorul unui spectrofotometru VSU -1 Zeiss, repartiția hipofazică între eter de petrol și metanol 95% și reacția cu acid clorhidric conc. în eter etilic pentru epoxicarotinoide.

Determinări cantitative. Conținutul total de carotinoide al insectelor, cît și al frunzelor plantei gazdă s-a calculat din extincția citită la 440 nm, λ max. corespunzătoare extractului total în eter de petrol, folosind pentru coeficientul specific de extincție, $E^{1\%}_{1cm}$, valoarea medie de 2 500 (6).

Pentru determinările cantitative ale carotinoidelor separate cromatografic s-au folosit valorile extincțiilor la λ max. și coeficienții $E^{1\%}_{1cm}$ notați în tabelele 1 și 2 (7). Cantitatea relativă din fiecare pigment este dată ca procent din totalul de carotinoide, acesta fiind exprimat în mg/g material proaspăt.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul total de carotinoide al insectelor adulte de *Eurydema ornata* s-a găsit a fi de 0,063 mg la 1 g material proaspăt, în timp ce al frunzelor de *Lepidium draba*, cu care se hrănesc, este de 0,16 mg/g material.

Rezultatele privind proporția și natura carotinoidelor din insecte adulte de *Eurydema ornata* și din frunzele plantei gazdă sînt redate în tabelele 1 și 2.

Spre deosebire de celelalte două specii studiate anterior, *Crioceris duodecempunctata* (1) și *Phytodecta fornicata* (2) la care s-a observat o acumulare de carotinoide de către insecte, avînd în considerare conținutul total de carotinoide mult mai mare al insectelor decît al plantei gazdă, la *Eurydema ornata* depozitarea carotinoidelor este mult mai redusă. Astfel de fluctuații s-au observat și la alte specii de insecte și chiar în cadrul indivizilor unei singure specii cu toate că s-au hrănit pe aceleași specii de plante gazdă (8).

Deși nu se observă o corelație sistematică între conținutul bogat al plantei gazdă și un conținut corespunzător de bogat al insectelor în carotinoide, acumularea acestor substanțe de către insecte apare esențială nu numai pentru funcția vizuală normală (9), ci și pentru alte funcții (10) între care un loc deosebit de important îl ocupă semnalizarea prin culoare si secreții (8, 11—19), obiectiv al cercetărilor moderne în combaterea insectelor dăunătoare.

Multe din insectele studiate par să acumuleze doar carotinoidele din plantele gazdă (1, 8, 20), observîndu-se o oarecare acumulare selectivă în unele cazuri (8, 20), dar există și insecte capabile să le metabolizeze la ceto-carotinoide (2, 8, 21, 22).

In *Eurydema ornata*, după cum reiese din rezultatele experimentale înscrise în tabele, se regăsesc în mare parte carotinoidele plantei gazdă și anume : α-carotina, β-carotina, luteina și epoxicarotinoidele : 5, 6-epoxiluteina, 5, 8, 5', 8'-diepoxizeaxantină (auroxantină) și neoxantină. Carotinoidele epoxidice, prezente în planta gazdă în cantități apreciabile, n-au fost decelabile în extractul carotinoidic din insecte numai în canti-

tăţi mici, iar unele, ca auroxantina, n-au fost identificate. Acest fapt pledează pentru o acumulare selectivă a carotinoidelor plantei gazdă de către insecte, cu atît mai mult cu cît se observă şi o modificare în proporţia carotinoidelor acumulate de către insecte. În timp ce în planta gazdă predomină net luteina, insecta înmagazinează preferenţial β-carotina.

Faptul că cei doi pigmenţi neidentificaţi din insecte, de culoare galbenă pe cromatoplacă, sînt puternic adsorbiţi (Rf = 0,08 respectiv 0,02) au repartizare hipofazică de > 95%, în eter de petrol/metanol 95%, indică prezenţa mai multor grupări hidroxilice în molecula lor. De asemenea au fost semnalate pe cromatoplacă două zone, de culoare roză, care deşi au λ max. în regiunea în care absorb şi carotinoidele, prin reacţie cu H_2SO_4 conc. se colorează în roz şi nu în albastru, cum se colorează carotinoidele. Acest fapt dovedeşte că cele două zone de culoare roz corespund unor compuşi necaritinoidici.

În concluzie, insectele adulte de *Eurydema ornata* acumulează selectiv carotinoidele din frunzele de *Lepidium druba*, cu deosebită preferinţă β-carotina, fiind capabile doar într-un grad extrem de redus de a metaboliza aceste substanţe.

Prezentată la redacţie
la 27 ianuarie 1977

Catedra de biochimie din
Institutul agronomic
„Dr. Petru Groza"
Cluj-Napoca, România.
Department of Food Science and Technology, University of Rhode Island, Kingston, R. I. 02881, U.S.A.

INSECT CAROTENOIDS
III. CAROTENOIDS FROM BEETLES OF *EURYDEMA ORNATA*

(SUMMARY)

The carotenoids from beetles of *Eurydema ornata* were investigated comparatively with those from the host plant, *Lepidium draba*. In beetles the same types of carotenoids as in the host plant were identified, but the beetles stored selectively these pigments. Thus, the level of β-carotene amounted up to 56% of the total carotenoids in beetles and 6% in the host plant. No auroxanthin was found in beetles, though present at a significant level in the plant.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Tămaş şi T. Perju, St. cerc. biochim., **19**, 121 (1976).
2. V. Tămaş, V. Ciurdaru şi T. Perju, St. cerc. biochim., **19**, 209 (1976).
3. Z. Gradojevici, Plant Protection, Beograd, **26**, 22 (1954).
4. Al. Stankovici şi L. Uri, Zast. Bilja, **18**, 317 (1967).
5. A. Veerman, Comp. Biochem. Physiol., **36**, 749 (1970).

6. B.H. DAVIES, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, de T. W. Goodwin, Academic Press, 1976, vol. 2, p. 154.
7. B.H. DAVIES, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* de T. W. Goodwin, Academic Press, 1976, vol. 2, p. 108–115 şi 150–153.
8. J. FETWELL şi H. ROTHSCHILD, J. Zool, Lond, **174**, 441 (1974).
9. R. H DADD, Ann. Rev. Entomol, **18**, 381 (1973).
10. R.S. MUMMERY, M. ROTHSCHILD şi L. R. G. VALADON, Comp. Biochem. Physiol., (B) **50**, 23 (1973).
11. M. ROTHSCHILD, Trans. Roy Entomol., Soc., London, **113**, 101 (1961).
12. D.A. JONES, J. PARSONS şi M. ROTHSCHILD, Nature, London, **193**, 52 (1962).
13. T. REICHSTEIN, J. VON EUW, J. A. PARSON şi M. ROTHSCHILD, Science, **161**, 861 (1968).
14. J. MEINWALD, K. ERICKSON, M. HARTSHORN, Y, C. MEINWALD şi T. EISNER, Tetrahedron Lett., **25**, 2959 (1968).
15. T, EISNER, A. F. KLUGE, M.I. IKEDA, Y. C. MEINWALD şi J. MEINWALD, J. Insect Physiol, **17**, 245 (1971).
16. M. ROTHSCHILD şi J. FELTWELL, Proc. Roy. Entomol. Soc. (C), **37**, 29 (1972).
17. C.A. CLARKE şi P. SHEPPARD, Proc. Roy. Soc., London, (B), **184**, 1 (1973).
18. M. ROTHSCHILD, Proc. 1st Iht. Congr. Syst. Evol. Biol (1973).
19. N. MARSH şi M. ROTHSCHILD, J. Zool., London, **174**, 89 (1974).
20. J. FELTWELL şi L. R. G. VALADON, J. Insect. Physiol, **18**, 2203 (1972).
21. F. LEUENBERGER şi H. THOMMEN, J. Insect. Physiol., **16**, 1855 (1970).
22. L.R.G. VALADON şi R. S. MUMMERY, Comp. Biochem. Physiol. (B) **46**, 427 (1973).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 203–207, (1977)

CAROTINOIDE DIN INSECTE IV.*
CAROTINOIDE DIN OUĂ DE *PANONYCHUS ULMI*
(Fam. Tetranychidae)

V. TĂMAŞ+, V. CIURDARU+, K. L. SIMPSON+, T. PERJU++

Rezumat. Au fost cercetate carotinoidele din ouă de *Panonychus ulmi* comparativ cu cele din frunze de măr cu care s-au hrănit aceste insecte. În frunze de măr au fost identificate tipuri de carotinoide comune plantelor, în care predomină β carotina şi luteina.
În ouă de *P. ulmi* s-au identificat, pe lîngă cele din frunze şi o serie de cetocarotinoide, printre care predomină 3,4-diceto-β-carotina, 3, 4, 4'-triceto-β-carotina şi astacina. Din totalul carotinoidelor procentul în cetocarotinoide se ridică la 60–70%. Se prezintă o schemă de interconversiune a carotinoidelor din *P. ulmi*.

În continuarea cercetărilor noastre cu privire la pigmenţii carotinoidici şi a metaboliţilor lor din insecte dăunătoare plantelor agricole (1, 2, 3) s-a studiat conţinutul, natura şi interconversiunea carotinoidelor din ouă de *Panonychus ulmi Koch*, comparativ cu planta gazdă. *Panonychus ulmi* sau păianjenul roşu al pomilor are o răspîndire mai mare în America de Nord şi de Sud, în Noua Zeelandă şi în Japonia. În Europa a fost semnalat în majoritatea ţărilor (4, 5, 6). Apariţia acestui păianjen ca dăunător, îndeosebi în ţările europene, a fost sesizat în perioada 1945–1950, ca urmare a tratamentelor repetate aplicate plantaţiilor de pomi pentru combaterea dăunătorilor cu produse chimice clorurate şi organofosforice (4, 5, 6, 7). Acest păianjen este un dăunător polifag la pomi şi viţa-de-vie, dar preferă mărul. Atît păianjenul, femela şi masculul, cît şi ouăle sînt de culoare roşie. Ouăle de vară au culoarea gălbuie la apariţie şi brună-roşcată la sfîrşitul perioadei de incubaţie, iar ouăle hibernante au culoare roşcată. Păianjenul iernează în stadiul de ouă, depuse pe ramurile pomilor, îndeosebi în jurul mugurilor şi în crăpăturile scoarţei. Depunerea ouălor de iarnă începe în luna iunie şi continuă pînă la căderea frunzelor. Adulţii şi larvele se răspîndesc pe lăstari şi pe dosul frunzelor, înţeapă şi sug sucul celular, ceea ce determină depigmentarea frunzelor şi reducerea capacităţii lor de asimilare. Acest fapt determină reducerea mărimii, a greutăţii şi a calităţii fructelor, putîndu-se înregistra pierderi în recolte de pînă la 18% (6, 7, 8).

Primele încercări de determinare a naturii pigmenţilor din insecte ale fam. *Tetranychidae* au fost făcute de către Ewing în 1914, care a identificat un pigment galben prezent în sîngele şi ţesuturile păianjenului *T. uricae* şi a fost numit xantofilă (9). Goodwin (9) menţionează lucrarea

---

* Lucrarea face parte din Programul comun de cercetare al Intitutului agronomic, Cluj-Napoca, România şi Universităţii Rhode Island, Kingston, S.U.A.
\+ Pentru partea biochimică
\++ Pentru partea entomologică

lui Beament, care a găsit α-carotină și o altă carotinoidă în ouă de păianjen *Panonychus ulmi*. Metcalf și Newell au identificat β-carotină și astaxantină în mulți păianjeni dăunători ai pomilor (11, 12, 13, 14, 15), fără a reuși să identifice toate carotinoidele și să stabilească natura lor.

MATERIAL ȘI METODĂ

Extracția pigmenților. S-au utilizat ouă hibernante, recoltate în perioada de iarnă, de pe ramuri de măr. Recoltarea s-a făcut prin spălarea ramurilor cu un tifon îmbibat în acetonă. Tifonul s-a spălat după fiecare strujire, în acetonă, atît în scopul spălării, cît și a extragerii pigmenților. Extractul acetonic s-a trecut în eter de petrol, s-a spălat cu apă și apoi s-a uscat peste sulfat de sodiu anhidru. Din acest extract s-au separat și identificat pigmenții carotinoidici.

Saponificarea extractului. Extractul carotinoidic s-a supus saponificării prin adăugarea unui voum egal de KOH 15% etanolic, la temperatura camerei, timp de 2 ore, la întuneric (3,15). După saponificare, soluția pigmenților s-a introdus, în porțiuni, într-o pîlnie de separare, adăugînd și aproximativ 50 ml eter etilic. Soluția de pigmenți s-a evaporat la un volum mic.

Cromatografierea pigmenților. Separarea cromatografică a pigmenților s-a făcut din extract saponificat, utilizînd plăci de silicagel G. Cromatoplăcile au fost developate în sisteme de solvenți, ca : eter de petrol și eter de petrol/acetonă (5 :1). Valorile Rf ale pigmenților au fost comparate cu ale pigmenților autentici. Pigmenții au fost rași separat de pe cromatoplăci și eluați cu amestec de acetonă și metanol (10 :1). Soluția fiecărui pigment s-a trecut în eter de petrol și s-a spălat cu apă, iar apoi s-a făcut identificarea.

Identificarea pigmenților. Pentru identificarea carotinoidelor s-a înregistrat spectrele de absorbție utilizînd spectrofotometru VSU—1 Zeiss, s-au făcut cocromatograme cu pigmenți autentici și s-a efectuat repartiția hipofazică între eter de petrol și metanol 95%. Pentru epoxiluteină s-a făcut reacția cu HCl în soluție de eter etilic, test specific epoxicarotinoidelor (16). Pentru izocriptoxantină s-a efectuat și reacția de dehidrare cu formare de retrodehidro-β-carotină (17).

Pentru identificarea cetocarotinoidelor, pe lîngă testele obișnuite arătate mai sus, s-a efectuat reducerea grupărilor cetonice la grupări hidroxilice, cu $NaBH_4$ în soluție alcoolică. Spectrele de absorbție ale produșilor de reducere ai diferitelor cetocarotinoide au fost identice sau foarte apropiate cu ale β-carotinei. Prin deshidratarea produșilor de reducere în prezență de $HCl/CHCl_3$ s-au obținut diferite retrodehidro-β-carotine (retrodehidro-β-carotină, provenită din produsul de reducere al echinenonei, retrobisdehidro-β-carotină, din produsul de reducere al 3,4-diceto-β-carotinei și anhidroeșșolțxantinei din produsul de reducere al 3,4,4'-triceto-β-carotinei). Aceste retrodehidrocarotine au fost caracterizate prin λ max., Rf și cocromatogramă cu retrodehidrocarotine autentice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Natura și cantitatea relativă a carotinoidelor separate din ouă de *Panonychus ulmi* și din frunze de măr sînt redate în tabela 1, iar caracteristicile lor (valorile Rf, λ max. și reacțiile specifice) din extractul saponificat sînt redate în tabela 2.

Analizînd datele prezentate în tabela 1 reiese faptul că în frunze de măr predomină β-carotina, iar procentul acestui pigment în ouă de *P. ulmi* este de aproximativ 4 ori mai mic decît în frunze. În schimb în ouă predomină cetocarotinoidele. Prezența în procent ridicat a cetocarotinoidelor imprimă ouălor culoarea roșcată. Aceste fapte sînt în concordanță cu datele din literatură care arată că în alte specii de *Panonychus*, cum este *P. urticae* s-au identificat cetocarotinoide (13). Se cunosc și mutanți de *Panonychus* care conțin numai pigmenții carotinoidici luați din planta-gazdă, iar *Panonychus persimilis* nu este capabil de a

forma cetocarotinoide din pigmenţii carotinoidici preluaţi din plantă, ci doar de a-i depozita (15). Procentul ridicat de β-carotină în plantă şi de cetocarotinoide în ouă de *Panonychus ulmi* demonstrează faptul că precursorul este β-carotina, care este oxidată, printr-un şir de reacţii de

Tabela 1

Distribuţia carotinoidelor în ouă de *Panonychus ulmi* şi în frunze de măr

Carotinoide	Distribuţia (% din totalul de carotinoide)	
	Ouă de Panonychus	Frunze de măr
α-Carotină	0,1	2
β-Carotină	14	65
Echinenonă	1	—
5,8-Epoxi-β-carotină	2	—
Izocriptoxantină	4	—
3,4-Diceto-β-carotină	15	—
3,4,4'-Triceto-β-carotină	20	—
Astacină	14	—
Luteină	20	23
5,6-Epoxiluteină	5	5
Neoxantină	5	5

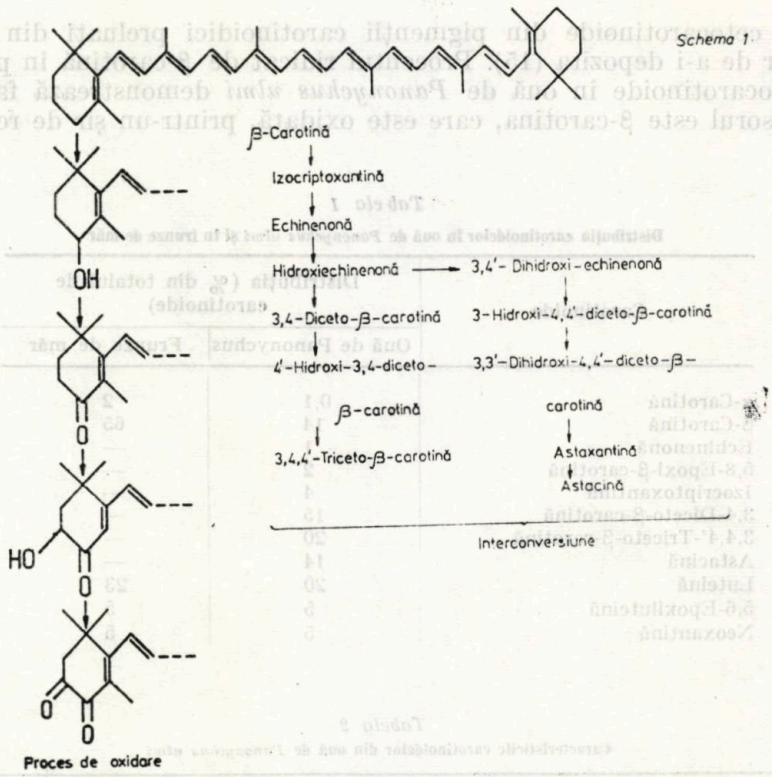
Tabela 2

Caracteristicile carotinoidelor din ouă de *Panonychus ulmi*

Carotinoide	Rf	λ max. în eter de petrol (în nm)	Repartiţie hipofazică între eter de petrol şi metanol 95% (în %)	Reacţia de culoare cu HCl în eter etilic
α-Carotină	0,85[a]	444,472	—	—
β-Carotină	0,79[a]	450,477	—	—
Echinenonă	0,50[b]	451	15	—
5,8-Epoxi-β-carotină	0,46[b]	442,470	20	albastru
Izocriptoxantină	0,40[b]	450,478	35	—
3,4-Diceto-β-carotină	0,36[b]	463	30	—
3,4,4'-Tricet-β-carotină	0,30[b]	469	60	—
Astacină	0,26	471	80	—
Luteină	0,20	444,473	80	—
5,6-Epoxiluteină	0,15	440,470	90	albastru
Neoxantină	0,50	412,434, 463	100	albastru

a = pe cromatoplacă de oxid de magneziu şi developare cu eter de petrol
b = pe cromatoplacă de silicagel şi developare cu amestec de eter de petrol şi 20% acetonă

oxidoreducere în care se formează carotinoide oxigenate pînă la cea mai oxigenată, astacina, care îşi păstrează sistemul polienic specific carotinoidelor. Acest proces de oxidoreducere şi interconversiunea carotinoidelor sînt redate în schema 1. Procesul redat în schema 1 are loc în organismul *Panonychus ulmi*, iar depozitarea se realizează cu precădere în ouă (18, 19).



Schema 1

Acumularea datelor privitor la studiul pigmenților carotinoidici din cît mai multe insecte dăunătoare plantelor vor fi utile nu numai pentru cunoașterea naturii și a produșilor lor de metabolizare, ci și pentru stabilirea unei corelații între planta-gazdă și insecte. Aceste corelații ar putea fi utile atît în combaterea biologică a dăunătorilor, cît și în clasificarea entomologică a insectelor.

Prezentat la redacție
la 28 mai 1977

Catedra de biochimie
din Institutul agronomic „Dr. Petru Groza"
Cluj-Napoca, Romania
Department of Food Science and Technology
University of Rhode Island, Kingston, U.S.A

INSECT CAROTENOIDS. IV
CAROTENOIDS FROM EGGS OF *PANONYCHUS ULMI*

(SUMMARY)

The carotenoids from eggs of *Panonychus ulmi* were investigated comparatively with those from the apple-tree leaves which these insects fed on. In the apple-tree leaves there were identified the common types of plant carotenoids among which β-carotene and lutein predominated.

Besides those from the apple-tree leaves, a series of ketocarotenoids were also identified in the eggs of *P. ulmi* among which 3,4-diketo-β-carotene, 3,4,4′-triketo-β-carotene and astacene prevailed. From the total carotenoids the percentage of ketocarotenoids was of 60—70. It is an interconversion scheme of carotenoids in *Panonychus ulmi*.

BIBLIOGRAFIE

1. V. TĂMAS, T. PERJU, St. cerc. biochim., **19**, 121 (1976).
2. V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, T. PERJU, St. cerc. biochim., **19**, 209 (1976).
3. V. TĂMAŞ, V. CIURDARU, K. L. SIMPSON, T. PERJU, St. cerc. biochim. (sub tipar).
4. H.J. HERBERT, K. BUTLER, Cand. Entomolog., **105**, 263 (1973).
5. C. MANOLACHE, A. SĂVESCU, FL. MANOLACHE, C. HRISAFI, I. CĂTUNEANU, *Situaţia dăunătorilor animali ai plantelor cultivate în anul 1952—1953* ICAR—Metode, Rapoarte, Memorii, nr. 19, Acad. R. P. R., Bucureşti (1956).
6. GH. LEFTER, Anal. Inst. Cercet. Prot. Plant., **5**, 329 (1967).
7. GH. LEFTER, Teză de doctorat, Inst. agr. Bucureşti, (1968).
8. VICTORIA SUTA, Anal. Prot. Pant., **3**, 275 (1965).
9. H. E. EWING, Oregon agric., exp. Sta. Bull., **121**, 1 (1914).
10. T.W. GOODWIN, *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Chapman and Hall, London (1952).
11. R.L. METCALF, I. M. NEWELL, Ann. ent. soc. Am, **55**, 350 (1962).
12. A. VEERMAN, Comp. Biochem. Physiol., **36**, 749 (1970).
13. A. VEERMAN, Comp. Biochem. Physiol., **42 B**, 329 (1972).
14. A. VEERMAN, Comp. Biochem. Physiol., **47 B**, 101 (1974).
15. A. VEERMAN, Comp. Biochem. Physiol., **48 B**, 321 (1974).
16. O. ISLER, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, p. 89 (1971).
17. P. KARRER, E. LEUMANN, Helv. Chim. Acta, **34**, 445 (1951).
18. F. LEUENBERGER, H. THOMMEN, J. Insect. Physiol., **16**, 1855 (1970).
19. L.R.G. VALADON, R. S. MUMMERY, Comp. Biochem. Physiol. (B), **46**, 427, (1973).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 209–221 (1977)

DETERMINAREA SEMICANTITATIVĂ A ACTIVITĂŢILOR ENZIMATICE PRIN DIFUZIE RADIALĂ ÎN GELURI

CONSTANŢA MUŞOLAN, S. VASU

Diversele aspecte de cercetare biochimică reclamă un număr mare de determinări ale activităţilor enzimatice, ceea ce implică alegerea unei metode simple, rapide, economice. O asemenea metodă pare să fie difuzia radială în geluri.

Această metodă a fost folosită prima dată în microbiologie pentru dozarea efectului antibioticelor asupra creşterii bacteriilor (1) (2). Ea este aplicată în analiza imunochimică cantitativă (3) (4) (5) (6), ca şi în evidenţierea activităţii unor enzime (7) (8) (9) (10) (11).

Relativ recent difuzia radială în geluri a fost introdusă ca metodă de dozare semicantitativă a activităţilor enzimatice (12) (13) (14), şi de calcul steochiometric al legării inhibitorilor de enzime (15).

Această metodă a fost aplicată în diferite domenii de cercetare, dintre care amintim influenţa compoziţiei mediului asupra biosintezei proteazelor şi amilazelor de către *Aspergillus terricola* (16), selecţia unor suşe de Actinomicete producătoare de proteaze (17), etc.

În laboratorul nostru difuzia radială în geluri a fost folosită în cercetarea influenţei diferitelor surse de carbon şi azot asupra biosintezei enzimelor pectolitice de către *Aspergillus niger*, a efectului unor detergenţi neionici şi anionici asupra producţiei unor enzime de către acest fung, ca şi în selecţionarea unor mutanţi obţinuţi prin gamma iradierea sporilor de *A. niger*.

MATERIAL ŞI METODĂ

Difuzia radială pentru determinarea cantitativă a enzimelor se face în geluri de agar sau agaroză, pe suporturi de sticlă. Concentraţia gelului este în general de 1%. Gelul este tamponat la pH-ul optim al enzimei testate, folosind tampoanele de compoziţie şi tărie ionică recomandate de metodele convenţionale. Substratul se incorporează în gel în concentraţii finale stabilite în prealabil. Grosimea stratuiui de gel este în general, de 2 mm, dar ea poate varia între 1,5 şi 5 mm. După turnarea şi solidificarea gelului, plăcile se păstrează în cameră umedă, la rece, cel puţin 6 ore înainte de folosire. După aceea placa de gel se perforează, iar în godeurile formate se aplică proba de analizat. Dimensiunile godeurilor variază între 1,5 mm—8,0 mm, iar volumele probelor aplicate în aceste godeuri variază şi ele între 2 µl şi 5 µl, sau mai mult. Probele se pot aplica fie folosind micropipete calibrate, fie prin umplerea totală a godeului respectiv.

După aplicarea probelor plăcile se transferă în camera umedă şi se ţin la temperatura optimă de acţiune a enzimelor respective timp de 4—24 ore, durată care variază în funcţie de mai mulţi factori, printre care greutatea moleculară a enzimei, concentraţia substratului, concentraţia enzimei în probă. Activitatea enzimei în timpul difuziei sale radiale determină în general apariţia unor zone circulare clare pe fondul relativ opac al gelului ce conţine substratul nehidrolizat sau formarea unui produs insolubil, de culoare diferită de a fondului. Deseori, pentru a creşte sensibilitatea reacţiei zona de difuzie a enzimei se poate vizualiza prin colorări specifice. Diametrele zonelor de difuzie se măsoară pe două direcţii perpendiculare, după care se face media.

Valorile diametrelor se convertesc în unități de activitate enzimatică, cu ajutorul unor curbe standard, trasate pentru probe etalon, care reprezintă variația diametrului zonei de difuzie în funcție de logaritmul concentrației (sau activității) enzimei. Este recomandabil ca asemenea curbe standard să se traseze pentru fiecare experiență, date fiind numeroasele variabile de care depinde exactitatea determinărilor.

Bineînțeles, plăcile de difuzie se pot fotografia, fie proiectîndu-le direct pe hîrtia fotografică, fie iluminîndu-le în cîmp întunecat.

Un criteriu al exactității măsurătorilor este eroarea experimentală. Aceasta se determină prin executarea în cît mai multe replicate a aceleiași determinări. Se măsoară diametrele zonelor de difuzie la toate replicatele efectuate; se calculează valoarea medie și deviația standard, din care se deduce eroarea experimentală. Un alt parametru statistic al exactității metodei este coeficientul de variație al reproductibilității. Aceasta se calculează convertind diametrele zonelor de difuzie în valori de activitate enzimatică, cărora li se determină media și deviația standard.

REZULTATE

Metode descrise în literatură

Dozarea activității enzimelor proteolitice prin difuzie radială este prezentată în tabela 1. Metoda este aplicabilă atît pentru proteaze alcaline, cît și pentru proteaze acide.

O problemă în dozarea proteazelor de pH alcalin este lipsa specificității. Astfel, hemoglobina folosită ca substrat pentru chimotripsină (18) (19) este hidrolizată și de pronază, tripsină și — în mai mică măsură — papaină și elastază. Deasemeni, fibrinogenul termodenaturat este hidrolizat de foarte multe enzime proteolitice (20). Totuși, el este recomandabil în difuzia radială, deoarece asigură pe o mare perioadă de timp o dependență lineară între diametrul zonei de difuzie și logaritmul activității enzimatice; excepție face tripsina, la care după primele două ore de difuzie rata creșterii diametrului zonei scade apreciabil, probabil datorită unui fenomen de autodigestie. În cazul elastazei, substratul acesteia, elastina, este specific; totuși elastaza are și o activitate protează nespecifică, ce poate fi inhibată cu tripsin-inhibitorul din soia (21). Dealtfel, includerea în gel a inhibitorilor specifici poate fi o cale de rezolvarea a problemei specificității de substrat, cu atît mai mult cu cît difuzia radială a fost folosită cu succes pentru identificarea unor inhibitori ai proteazelor.

Proteazele de pH acid (renină, pepsină etc.) pot fi testate cu succes folosind ca substrat cazeină, sau chiar lapte degresat (ca atare sau liofilizat). Datorită insolubilității cazeinei la pH-uri acide, tehnica de lucru în aceste cazuri este oarecum modificată (14).

Sensibilitatea metodei de difuzie radială pentru dozarea activităților proteazice este bună. Relația diametrul zonei de difuzie — logaritmul concentrației enzimei este lineară pe intervale mari ale concentrației enzimei. În cazul pepsinei însă, linearitatea nu mai este respectată la condiții de enzimă mai mici de 30 ng, probabil datorită inhibării enzimei de către substrat; totuși hidroliza peptică era încă sesizabilă la 10 ng enzimă. Uneori, sensibilitatea metodei de difuzie radială este mai mare decît a metodelor convenționale. Astfel dozarea pepsinei prin fotometrie de absorție are o sensibilitate de 3 μg pepsină/ml probă (deci de 300 ori mai mică), în timp ce dozarea proteazelor din A. terricola după o modificare a metodei Kunitz (23) este sensibilă la concentrații de enzimă mult mai mari decît cele detectate prin difuzie radială.

Tabela 1

Dozarea activității proteazelor prin difuzie radială

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Caracteristici ale gelului	Condiții de incubare	Sensibilitate	Eroare experimentală	Coeficient de variație	Indic. bibliog.
1.	Proteaze nespecifice (chimotripsină din pancreas de bovină) 21,5 U/mg	Hemoglobină de bovină (termodenaturată) 0,05 %	Agar 1 % h = 2 mm Ø = 1,5 mm v = 2 ul	0,05M Tris 0,01M $CaCl_2$ pH 8,0	0,025—10 mg/ml (1,1—440 mU/probă)	2,1 %	7,1 %	12,13
2.	Proteaze nespecifice (tripsină din pancreas de bovină) 205 U/mg	Fibrinogen de bovină 0,05 %	Agar 1 % h = 2 mm Ø = 1,5 mm v = 2 ul	0,05M Veronal 0,1M NaCl pH 7,8 2h, 25°C	0,005—1 mg/ml (2—400 mU/probă)	1,2 %	8,6 %	12,13
3.	Elastaza (pancreas de porc) 13 U/mg	Elastină 80 mg %	Agar 1 % h = 2 mm Ø = 1,5 mm v = 2 ul	0,2M Tris-HCl pH 8,8 16h, 25°C	0,1—10 mg/ml (2,6—260 mU/probă) minimum : 50μg/ml (1,3 mU/probă)	3,2 %	6,9 %	12,13
4.	Pepsină (porcină)	Purdă de lapte degresat 0,33 %	Agaroză 1 % h = 1,5 mm Ø = 2,5 mm v = 5 ul	0,1M acetat (formiat) pH 2,8—5,2 20h, 37°C	0,006—2 mg/ml (30 ng—10 μg/probă) minimum : 2 μg/ml (10 ng/probă)	1 %	—	14
5.	Proteaze (acide tip renină ; alcaline Actinomicete)	Caseină Hammarsten 1 %	Agar 1,5 % Ø = 8 mm	0,1M acetat pH 5,2 ; 0,2M Tris pH 8,5 ; 12—18 h ; 27—37—52°C	—		—	17
6.	Renină	Caseină Hammarsten 1 %	Agar 1,5 % Ø = 8 mm	0,2M acetat 1 mM $CaCl_2$ pH 5,2 12 h, 37°C	0,01—1 mg	—	—	17
7.	Proteaze (Aspergillus terricola)	Lapte degresat 20 % (u/v)	Agar 1,2 % h = 5 mm Ø = 7 mm v = 0,1 ml	0,1M fosfat pH 7,4 18 h, 37°C	—	—	—	16

Zonele de difuzie s-au evidențiat astfel : 1, 2, 3, Clarifierea zonei de difuzie radială ; 4 Coomassie Brilliant Blue sau Amidoblack, 5, 6, 7 Precipitare cu T C A 5%

Reproductibilitatea metodei este bună în condiții de lucru standardizate, mai ales prin comparație cu alte metode (de ex. dozarea fotometrică a pepsinei are o eroare experimentală de ± 8%) (22).

Un alt avantaj al metodei de difuzie radială pentru dozarea proteazelor este că aprecierea activității hidrolitice se poate face direct, prin măsurarea zonei clare apărute pe fondul opac al proteinei nehidrolizate, deci fără colorări suplimentare. În acest sens menționăm că măsurătorile diametrelor zonelor de difuzie variază în funcție de prelucrarea ulterioară a plăcilor.: în cazul proteazelor din *A. terricola*, diametrele zonelor de difuzie măsurate pe placa neprelucrată erau cu 30% mai mici decît cele măsurate după precipitarea cu TCA 5%.

Dozarea activității nucleazelor prin difuzie radială este prezentată în tabela 2. Ambele enzime au fost testate la pH 7,0, dar metoda poate fi ușor adaptată și pentru nucleaze de pH acid, folosind agaroza în loc de agar.

Dreapta reprezentînd relația diametrul zonei de difuzie — logaritmul concentrației DN-azei are pante diferite în domeniul 0,1—5 μg/ml, respectiv 5—500 μg/ml, probabil datorită unei inhibiții de către substrat. Această observație nu este valabilă și pentru RN-aze, reprezentarea semilogaritmică fiind continuă pe întreg intervalul 0,1—1000 μg/ml enzimă.

Viteza de difuzie este mare în cazul RN-azei, dată fiind greutatea moleculară mică a acestei enzime. De aceea timpul de incubare nu trebuie să depășească 6 h, deoarece după această limită nu se mai pot măsura cu exactitate. Deasemeni DN-azele pot fi dozate în condiții bune după numai 4 ore de difuzie, totuși pentru a avea o rezoluție bună între valori de activitate DN-azică apropiate, se recomandă o incubare de 16 ore.

Menționăm că zonele de difuzie ale nucleazelor se pot aprecia direct, datorită clarificării ariei hidrolizate. Totuși, sensibilitatea metodei crește mult dacă măsurătorile se fac după colorarea plăcilor, cînd zonele de difuzie apar incolore pe fondul substratului nehidrolizat colorat. Cel mai recomandabil colorant este bromura de etidiu, care datorită înaltei sale specifități pentru acizii nucleici și proprietății de inhibitor al nucleazelor, elimină etapele de fixare și spălare, simplificînd mult tehnica de colorare(24).

Pe lîngă alte avantaje, evidențierea activității nucleazice prin difuzie radială este și economică. Astfel, pentru același număr de determinări prin difuzie radială se consumă o cantitate de substrat de 4—8 ori mai mică decît prin metoda Egami (25).

Dozarea amilazelor prin difuzie radială este prezentată în tabela 3. Și în cazul amilazelor se constată o abatere de la linearitate a reprezentării semilogaritmice la concentrații de enzimă mai mici de 5 μg/ml. Este vorba probabil de o inhibiție de substrat, cu atît mai mult cu cît scăderea concentrației amidonului la 0,05% anulează această abatere. Dacă se crește concentrația substratului la 5%, diametrele zonelor de difuzie scad, dar panta dreptei nu se modifică. Așadar, este clară importanța stabilirii în prealabil a concentrației optime de substrat pentru creșterea sensibilității metodei. Din acest punct de vedere, concentrația amidonului din a doua dozare menționată în tabel pare cam mare, ceea ce explică volumul mare de probă necesar pentru decelarea activității amilolitice (100 μl față de 2 μl folosiți de primii autori). În dozările prezentate colorarea se face după difuzie, totuși zonele de liză se pot vizualiza direct, folosindu-se ca substrat amidon conjugat în prealabil cu un colorant (26).

Tabela 2

Dozarea activității nucleazice prin difuzie radială

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Caracteristici ale gelului	Condiții de incubare	Sensibilitate	Eroare experimentală	Coeficient de variație	Indic. bibl.
1.	Dezoxiribonucleaza (DN-aza I din pancreas de bovină	DNA înalt polimerizat din timus de vițel 0,1%	Agar sau Agaroză 1% $h = 2$ mm $Ø = 1,5$ mm $v = 2$ µl	0,1M Tris 25 mM $MgCl_2$ pH 7,0 16 h, 25°C	5—500 µg/ml (20—2000 mU/probă) minimum: 0,1 µg/ml 0,4 mU/probă)	1,5%	8,1%	12,13
2.	Ribonucleaza (RN-aza A din pancreas de bovină) 1450 U/mg	RNA din drojdie 0,15%	Agar sau Agaroză 1% $h = 2$mm $Ø = 1,5$ mm $v = 2$ µl	1,30M fosfat pH 7,0 3—6 h, 25°C	0,1—1000 µg/ml (0,2—3000 mU/probă)	1,4%	10,2%	12,13

Colorarea plăcilor 1.a. 0,01% Pironină Y în 0,85% NaCl și 10 mM citrat de sodiu. b. 0,15% bromură de etidiu în 0,85% NaCl pH 7,0. 2. 0,1% bromură de etidiu în 0,85% NaCl, pH 7,0.

Tabela 3

Dozarea activităților amilazice prin difuzie radială

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Caracteristici ale gelului	Condiții de incubare	Sensibilitate	Eroare experimentală	Coeficient de variație	Indic. bibl.
1.	Alfa amilaza (Pancreas de porc)	Amidon solubil 0,1%	Agar 1% $h = 2$ mm $Ø = 1,5$ mm $v = 2$ µl	0,01M fosfat 0,01M NaCl pH 7,0 12—16 h, 25°C	5—1000 µg/ml (6—1800 mU/probă) minimum: 1µg/ml (1,2 mU/probă)	0,8%	6,9%	12,13
2.	Amilaze (Aspergillus terricola)	Amidon solubil 0,5%	Agar 1,2% $h = 5$ mm $Ø = 7$ mm $v = 0,1$ ml	0,1M acetat de Na; pH 4,6 18 h, 37°C	—	—	—	16

Colorarea gelurilor: 1.Hîrtie de filtru îmbibată în soluție Lugol (5% I_2 în 10% KI) 2. 0,3% I_2 în 3% KI

Tabela 4

Dozarea activităților unor enzime prin difuzie radială

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Caracteristici ale gelului	Condiții de incubare	Sensibilitate	Eroare experimentală	Coeficient de variație	Indic. bibl.
1.	Muramidaza (Lizozim din ovalbumină, 5000 U/mg)	Micrococcus lysodeikticus (celule uscate) 30 mg%	Agar 1% $h = 2$ mm Ø = 1,5 mm $v = 2$ µl	1/15M fosfat pH 7,0 16 h, 25°C	5—1000 µg/ml (0,050—10 U/probă)	1,7%	9,2%	12,13
2.	Urokinaza (Activatorul plasminogenului) 4000 U/ml	Plasminogen din fibrinogen de bovină 1%	Agar 1% $h = 2$ mm Ø = 1,5 mm $v = 2$ µl	0,05M Veronal 0,1M NaCl pH 7,8 16 h, 25°C	1—1000 U/ml (2—2000 mU/probă)	1,2%	7,1%	12,13
3.	Fosfataza alcalină (intestin de pui) 2,3 U/mg	Naftol AS-GR-fosfat 80 mg%	Agar 1% $h = 2$ mm Ø = 1,5 mm $v = 2$ µl	0,1M Tris-HCl pH 8,0 16 h, 25°C	0,02—10 U/ml (0,04—20 mU/probă)	1,2%	7,6%	12,13
4.	Fosfataza acidă (Embrioni de grîu) 0,21 U/mg	Naftol AS-GR-fosfat 25 mg%	Agar 1% $h = 2$ mm Ø = 1,5 mm $v = 2$ µl	0,1M acetat de sodiu pH 5,0 8—12 h, 25°C	1—60 U/ml (2—120 mU/probă)	2,1%	9,0%	12,13

Tabela 5

Evidențiera proteazelor în omogenatul și mediu de cultură de A. niger

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Condiții de incubare	Prelucrarea plăcii		
				Fixare	Colorare	spălare
1.	Proteaza I (pH 2,8)	Caseină Hammarsten 0,5%	Citrat 0,05M Fosfat 0,1M pH 2,8 18 h, 30°C	Acid acetic-etanol-apă (2 : 60 : 38), 1h	Amidoblack 0,1%, 15 min	Acid acetic 7%
2.	Proteaza II (pH 6,5)	Caseină Hammarsten 0,5%	Citrat 0,05M Fosfat 0,1M pH 6,5 18 h, 30°C	Acid acetic-etanol-apă (2 : 60 : 38), 1h	Amidoblack 0,1%, 15 min	Acid acetic 7%
3.	Proteaza III (pH 8,0)	Caseină Hammarsten 0,5%	Tris-HCl 0,05M pH 8,0 18 h, 30°C	Acid acetic-etanol-apă (2 : 60 : 38), 1h	Amidoblack 0,1%, 15 min	Acid acetic 7%

Alte enzime dozate prin difuzie radială sînt prezentate în tabela 4. Menționăm dintre acestea în special fosfatazele. Dintre toate enzimele prezentate în cele 4 tabele, acestea sînt singurele hidrolaze care folosesc ca substrat o substanță cu greutate moleculară mică, solubilă în apă. Metoda se bazează pe formarea produsului de reacție naftol-AS-GR, colorat, insolubil, care delimitează zona de difuzie a enzimelor. Trebuie menționat că în cazul fosfatazelor alcaline zonele de difuzie apar ca două inele concentrice diferit colorate, semnificînd probabil două forme moleculare diferite în proba analizată, întrucît reprezentările grafice ale diametrelor celor două inele concentrice sînt două drepte paralele, în domeniul de concentrație testat.

Metode adaptate pentru evidențerea activității unor enzime (proteaze, nucleaze, amilaze) din fungul *A. niger*.

Proteazele din A. niger au fost evidențiate după cum se arată în tabela 5.

Acestea s-au testat la pH-urile și tampoanele indicate de Hagihara pentru aspergillopeptidaze (27). În încercări preliminare am folosit ca substrat caseina și gelatina, în concentrații finale de 0,5%—2%, constatînd că optimum de concentrație este de 0,5% și chiar 0,25%, mai mic decît cel folosită de alți autori (14) (17); tehnica de lucru a fost modificată, ținînd seama de solubilitatea redusă a caseinei la pH-uri acide. Prezentăm în fig. 1 difuzia radială a proteazelor de pH 2,8 din omogenatul și mediul de cultură de *A. niger*.

Difuzia radială a nucleazelor și amilazelor din A. niger este dată în tabela 6. DN-azele s-au dozat la pH 5,4 și 7,8 după Kato și Ikeda (28). În testări preliminare am folosit ca substrat ADN înalt molecular și ADN degradat, atît nativ cît și termodenaturat. Întrucît, comparativ, rezultatele obținute cu ADN degradat termodenaturat erau asemănătoare cu cele obținute cu ADN înalt molecular, din motive de economie de reactiv și de timp, în toate experiențele am folosit ADN degradat termodenaturat. Pentru colorare am folosit bromura de etidiu (24), verde de metil 0,25% în acetat 0,2 M, pH 4,1 o oră (29), acridin oranj 1 : 10 000 (g :v) în acetat de sodiu — HCl 1N, pH 4,2 (30), și albastru de toluidină 0,3% în acid acetic 1%, pH 4,2, 10 min (31); primii doi coloranți, legîndu-se exclusiv de ADN înalt molecular duc la evidențierea unor zone de hidroliză clare, în timp ce albastru de toluidină complexează și produșii de hidroliză, astfel încît zonele de difuzie apar ca inele concentrice colorate cu diferite intensități. Totuși, întrucît albastrul de toluidină poate fi folosit și pentru colorarea DNA degradat, l-am preferat celorlalți coloranți. Diametrele zonelor de difuzie ale DN-azelor de *A. niger* sînt dependente liniar de logaritmul activității enzimatice, dar pe un diametru mult mai restrîns decît cel menționat de alți autori (12). Exemplificăm dozarea DN-azelor prin difuzie radială în fig. 2 (DN-aze din mutanți de *A. niger* evidențiate față de ADN, colorat cu bromură de etidiu).

Tabela 6

Evidențierea nucleazelor și amilazelor din omogenatul și mediul de cultură de *A, niger*

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Condiții de incubare	Prelucrarea plăcii		
				Fixare	Colorare	Spălare
1.	DN-aza I (pH 5,4)	DNA 0,1%	Acetat 0,1M $MgCl_2$ 25 mM pH 5,4 16 h, 30°C	Acid acetic-etanol-apă (5 : 20 : 75), 2h	Albastru de toluidină 0,3%, 10 min	Acid acetic 2%
2.	DN-aza II (pH 7,8)	,,	Tris-HCl 0,1M $MgCl_2$ 25 mM pH 7,8 16 h, 30°C	,,	,,	,,
3.	RN-aza I (pH 4,5)	RNA 0,15%	Citrat 0,05M Fosfat 0,1M pH 4,5 18 h, 30°C	,,	,,	,,
4.	RN-aza II (pH 6,4)	,,	Citrat 0,05M Fosfat 0,1M pH 6,4 18 h, 30°C	,,	,,	,,
5.	Amilaze	Amidon 0,2%	Citrat 0,05M Fosfat 0,1M pH 4,8 20 h, 30°C	—	5% I_2 în 10% KI, 2 min	—

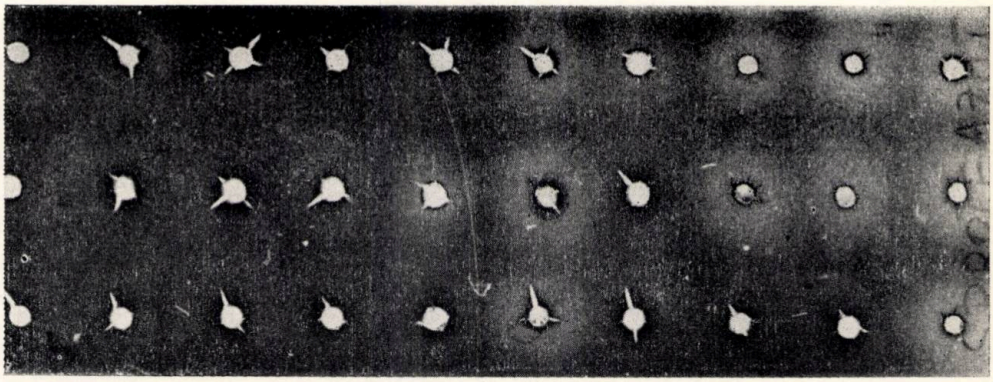


Fig. 1 — Difuzia radială a proteazelor de pH 2,8 din omogenatul și lichidul de cultură de *A. niger* crescut în prezența detergenților.

Testările s-au făcut la vîrsta de 2 zile (2), 4 zile (4) și 6 zile (6).
M: cultura martor; *NO*; cultură în prezență de Nonidet; *TW:* cultură în prezență de Tween; *TX:* cultură în prezență de Tritonx100; *DOC* cultură în prezență de desoxicolat de sodiu.

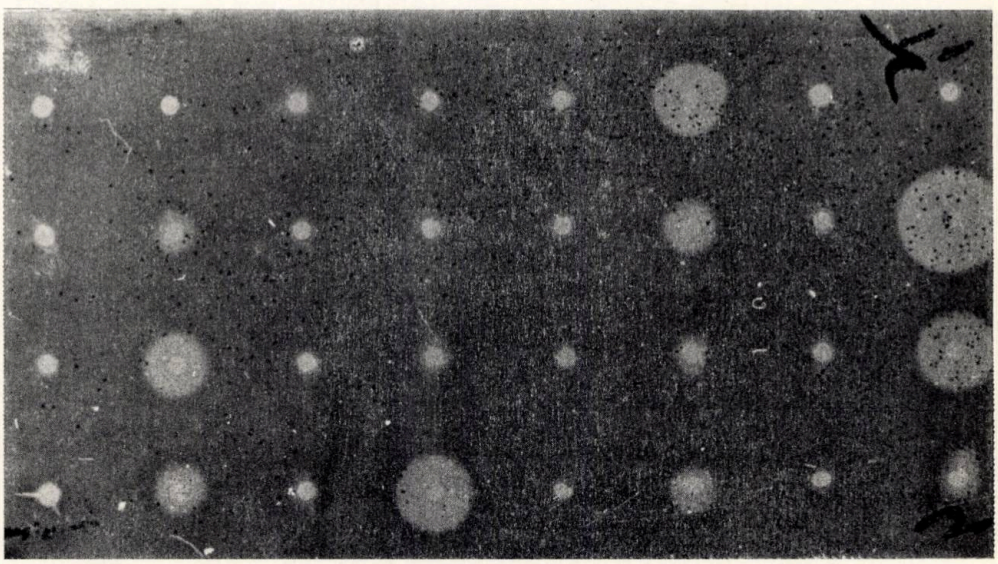


Fig. 2. — Difuzia radială a DN-azelor de pH 7,8 din omogenatul și lichidul de cultură a sușei sălbatice și a unor mutanți de *A. niger*.

Primele două godeuri (stînga sus) corespund culturii sălbatice.

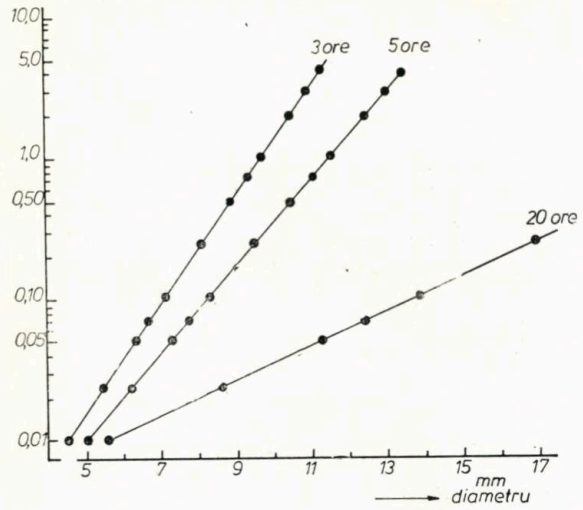


Fig. 3. — Curba standard de determinare a PG prin difuzie radială în gel de agaroză — acid pectic.

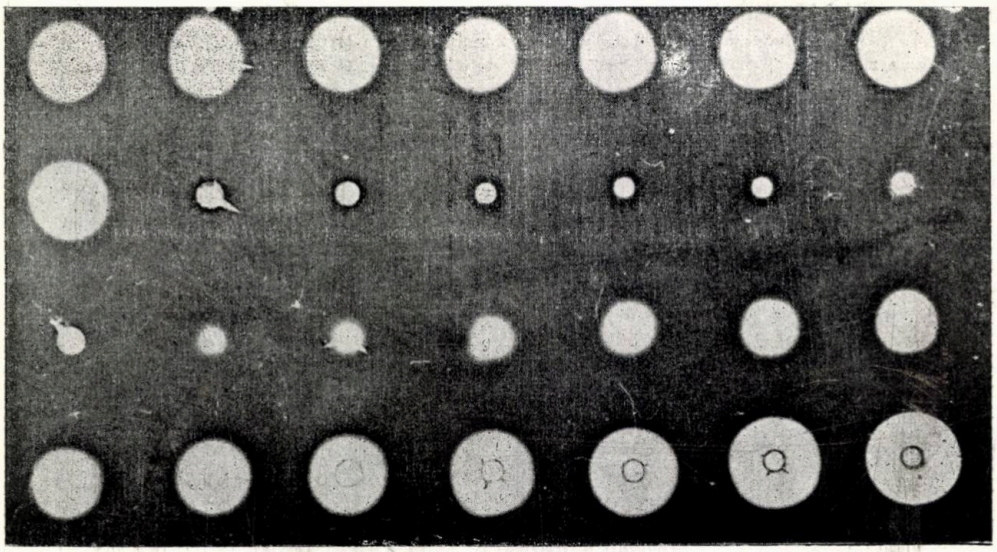


Fig. 4. — Difuzia radială a PG în gel de agaroză — acid pectic.
Concentrațiile PG variază de la 4 UPG_2/ml (primul godeu din stînga, sus) la 0,0001 UPG_2/ml, ultimele 8 godeuri conțin replicate cu cîte 0,5 UPG_2/ml.

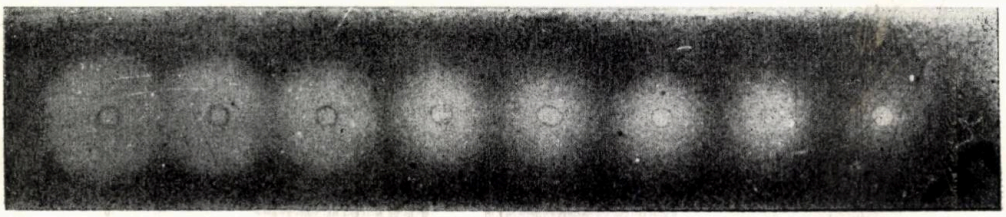


Fig. 5. — Difuzia radială a celulazei în gel de agaroză-carboximetil celuloză.
Concentrația enzimei a variat între 1mg/ml (1) și 100mg/ml (8).

Metode originale de determinare semicantitativă a activității enzimelor pectolitice și celulazei prin difuzie radială în geluri

Activitatea enzimelor pectolitice (poligalacturonaza-PG, polimetilgalacturonaza-PMG și pectintranseliminaza-PTE). Tehnicile elaborate în acest scop au la bază metoda de determinare a activității poligalacturonazice (PG) pe plăci de agar-agar cu adaus de substanțe pectice (34) (35), ca și tehnicile puse la punct anterior de noi pentru evidențierea formelor moleculare multiple ale PG și PMG (36), respectiv PTE (37), separate electroforetic în gel de poliacrilamidă.

Detaliile de tehnică sînt prezentate în tabela 7.

Pentru stabilirea curbelor standard, activitățile enzimatice s-au dozat, după cum am arătat în alte lucrări (38) (39) prin creșterea puterii reducătoare a sistemului de reacție ce conținea acizi pectici (PG), prin scăderea vîscozității sistemului de reacție ce conținea acizi pectinici (PMG), sau prin creșterea DO_{235} a sistemului de reacție ce conținea acizi pectinici (PTE).

Am constatat o dependență lineară între diametrul zonei de difuzie și logaritmul activității enzimatice, a cărei pantă depinde de timpul de incubare (fig. 3). Imaginea difuziei radiale a soluțiilor de PG de concentrație diferită (4 U/ml — 0,0001 U/ml) ca și a opt replicate conținînd cîte 0,5 U/ml, timp de 5 ore, este dată în fig. 4. Imagini asemănătoare se obțin și pentru PMG, respectiv PTE.

În comparație cu alte tehnici, metoda propusă pentru dozarea PG permite evidențierea acestei activități și la pH-uri acide, și delimitează mai net zonele de difuzie, prin colorarea substratului cu albastru de toluidină. Pe de altă parte, determinarea activităților PMG și PTE prin difuzie radială nu a mai fost descrisă pînă acum în literatură, în nici o variantă.

Activitatea celulolitică. Detaliile de tehnică pentru evidențierea activității celulolitice sînt prezentate în tabela 7. În cazul în care s-a testat activitatea celulazică din Aspergillus niger, condițiile de lucru s-au adaptat parametrilor optimi ai acestei enzime (pH 4,5, temperatură de incubare 40°C) (40) (41).

Folosind celulaza Merck, am constatat o dependență a diametrului zonei de difuzie de pH-ul de timpul de incubare. Diametrul zonei de difuzie variază direct proporțional cu logaritmul concentrației enzimei în domeniul 1—25 mg/ml (fig. 5).

Metoda, deși semicantitativă și limitată la un domeniu restrîns de activitate enzimatică, este mult mai simplă decît alte tehnici. Menționăm astfel evidențierea activității celulazice prin colorarea cu albastru de toluidină care se leagă de grupările carboximetil din molecula substratului, și nu prin dozarea puterii reducătoare a produșilor de hidroliză (42).

Metoda este foarte sensibilă permițînd decelarea a 10 μg celulază și chiar mai puțin, în comparație cu metoda cu acid dinitrosalicilic (concentrație minimă decelabilă 50 μg) (43) sau cu cea ce folosește celulozo-Azur (40 μg) (44).

Sensibilitatea metodei propuse de noi este comparabilă cu cea a unei tehnici recente (45), care însă este mult mai laborioasă, presupunînd

Tabela 7

Metode originale de determinare a activității enzimelor pectolitice și celulolitice prin difuzie radială

Nr. crt.	Enzima	Substrat	Suport	Incubare	Prelucrarea plăcii			Sensibilitate	Eroare experim.
					Fixare	Colorare	spălare		
1.	Poligalacturonaza (PG-A. niger)	acizi pectici 0,5%	agaroză 1% $h = 2$ mm $Ø = 3$ mm $v = 14$ µl	Mc Ilvaine pH 4,2 5 h, 30°C	HCl 0,1N 20 min	AT 0,2% în acid acetic 1% 20 min	Acid acetic 2%, H_2O dist.	10^{-3} U/ml ($1,4 \times 10^{-5}$ U/probă)	2,5%
2.	Polimetilgalacturonaza (PMG-A. niger)	acizi pectinici 0,5%	,,	,,	—	Roșu de ruteniu 0,05% 20 h	—	5×10^{-3} U/ml 7×10^{-5} U/probă)	1,6%
3.	Pectintranseliminaza (PTE-A. niger)	acizi pectinici 0,5%	,,	Mc Ilvaine pH 5,1 5 h, 30°C	—	,,	—	5×10^{-2} U/ml (7×10^{-4} U/probă)	3,8%
4.	Celulaza (2327, Merck)	Na-CM-celuloză 0,5%	agaroză 1% $h = 2$ mm $Ø = 3$ mm $v = 10$ µl	Acetat-acid acetic 0,2 M	Uscare prin presare ($10g/cm^2$)	AT 0,3% acid acetic 2%	Acid acetic 2% H_2O dist.	1—25 mg/ml (2—50 U/ml) (0,02—0,5 U/probă)	3,0%

legarea covalentă a trinitrobenzenului, respectiv fluorescaminei, de substrat (CM — sau DEAE celuloză) și dozarea spectrofotometrică sau spectrofluorimetrică a produșilor de reacție.

DISCUȚII

Luînd în considerație atît datele din literatură, cît și rezultatele obținute în laboratorul nostru, putem spune că difuzia radială în geluri este o micrometodă semicantitativă de dozare a activităților enzimatice de tip hidrolazic (și, mai ales, depolimerazic), foarte avantajoasă atunci cînd este nevoie de analiza în serie a unui mare număr de probe, fără o foarte mare precizie.

După cum am mai arătat, în anumite limite de concentrație ale enzimelor, se poate stabili o relație liniară între diametrul zonei de difuzie a enzimei și logaritmul concentrației acesteia. Această dependență semilogaritmică este oarecum surprinzătoare, deoarece, conform legilor difuziei, ar trebui ca liniaritatea să se stabilească între pătratul razei zonei de difuzie și logaritmul concentrației enzimei. Această discrepanță nu a fost încă explicată, totuși s-ar putea ca ea să se datoreze unei viteze de difuzie a enzimei diferită în centrul zonei, față de periferie. Pe de altă parte menționăm că liniaritatea nu este respectată dacă au loc fenomene de autodigestie, inactivare, sau dacă raportul enzimă/ substrat nu are valoarea optimă. De altfel, s-a constatat că proteina enzimatică peroxidaza migrează în gel respectînd tot o relație liniară semilogaritmică (12).

Interpretarea relației activitate enzimatică-zonă de difuzie se poate face prin analogie cu imunodifuzia radială. În acest caz s-a arătat că în primele etape ale imunodifuziei există o relație liniară între diametrul zonei de difuzie și logaritmul concentrației antigenului, în etapele ulterioare însă, cînd proporția dintre antigen și anticorp se schimbă în favoarea anticorpului, viteza de difuzie scade mult, pînă la precipitarea antigenului (3), deci relația liniară nu mai este respectată. În cazul enzimelor procesul de difuzie nu este modificat semnificativ, decît dacă substratul se află în concentrație prea mare (46). Totuși, o abordare matematică a procesului de difuzie radială a enzimelor în gelul ce conține substratele corespunzătoare este mult înlesnită de existența unor lucrări de acest gen efectuate asupra unor procese similare de analiză imunochimică. Menționăm doar, pe lîngă lucrarea lui Mancini (3), teoria matematică a imunodifuziei elaborată de Aladjem și Palmiter (47), care permite determinarea coeficienților de difuzie. Există de asemenea unele încercări de cuantificare pe baze matematice (48) a metodei de imunoelectroforeză a lui Laurell (49). Recent, a fost prezentată o teorie matematică (50) (52) a procesului de fixare a complementului (53) (54).

Difuzia radială a enzimelor are o eroare standard — în cazurile citate în literatură — comparabilă cu cea a altor tehnici ce folosesc difuzia în agar (1) (4) (49). Totuși, măsurătorile pot varia de la o placă la alta, după cum am observat și noi și alți autori (3) (11). Reproductibilitatea metodei este de asemeni bună, de ordinul de mărime citat și pentru alte tehnici de difuzie în agar (5) (6) (11). Sensibilitatea dozării enzimelor prin difuzie radială este apropiată de cea a analizei imunochimice (3).

Domeniul de concentrații enzimatice în care metoda este aplicabilă a fost menționat de alți autori ca fiind foarte larg (0,1 μg/ml — 1000 μg/ml); în condițiile noastre însă, domeniul de lucru este mult mai restrîns, iar capacitatea de rezoluție destul de limitată.

Micrometoda semicantitativă de dozare a enzimelor prin difuzie radială este limitată — cel puțin deocamdată — la depolimeraze și unele hidrolaze.

Totuși, această metodă are marele avantaj al rapidității, simplității, economiei de reactivi și aparatură.

Ea este foarte utilă în screening, atît în biochimia preparativă (dozarea activităților enzimatice în eluatele cromatografice sau electroforetice), cît și în testări biochimice ale microorganismelor (selectări de mutanți, normarea mediilor de cultură, superproducție de enzime etc.), dovedindu-se un bun instrument de lucru în laboratoarele de biochimie, microbiologie etc.

NOTA

La alcătuirea acestui referat au mai colaborat: Lilica Botoșeneanu și dr. Corina Iordache.

Prezentat la redacție
10 mai, 1977

Institutul de Științe Biologice, București
Colectivul de acizi nucleici și biosinteza enzimelor

BIBLIOGRAFIE

1. L.F. Knudsen, Science, *101*, 46 (1945).
2. K.A. Brownles, P. K. Loreaine, J. Stephens, J. Geu, Microbiol, *3*, 347 (1949).
3. G. Mancini, A.O. Garbonara, J.F. Heremans, Immunochemistry, *2*, 235 (1965).
4. V. Lopez, S. Golder, Clin. Chim. Acta, *21*, 517 (1968).
5. J. L. Fahey, E. M. Kelvey, J. Immunol., *94*, 84 (1965).
6. C.A. Ryan, Anal Biochem., *19*, 434 (1967).
7. G.F.B. Schumacher, J. Reprod. Med., *1*, 61 (1968).
8. G.F.B. Schumacher, M. J. Pearl, J. Reprod. Med., *3*, 171 (1969).
9. E.F. Osserman, D. P. Lawlor, J. Exp. Med., *124*, 921 (1966).
10. K. Moettolnen, J. Sci. Food., Agr., *21*, 261 (1970).
11. J. Mestecky, F. W. Kraus, D. C. Hurst, S. A. Voight, Anal. Biochem., *30*, 190 (1969).
12. W.B. Schill, G. F. B. Schumacher, Anal. Biochem., *46*, 502 (1972).
13. G.F.B. Schumacher, W. B. Schill, Anal. Biochem., *48*, 9 (1972).
14. H. Lovenstein, A. Jngild, Anal Biochem., *71*, 204 (1976).
15. V. Neuhoff, W. B. Schill, H. Sternbach, Biochem., J., *117*, 623 (1970).
16. V.V. Korsunov, Priol. biol. mikrobiol., **IX**, 877 (1973).
17. T.F. Kuimova, A. N. Paronian, N.A. Krasilnikov, Priol. biol, microbiol, *9*, 599 (1973).
18. H.U. Bergmeyer, în *Methods of enzymatic Analysis*, Verlag Chemie, 1965, p. 808.
19. M.L. Anson, J. Gen. Physiol, *22*, 791 (1939),
20. N. Heimiburger, H. Haupt, H. G. Schwick, in Proc. Intl. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors (München 1970), De Gruyter, 1971, p. 1.
21. R.L. Walford, B. Kickhoeffen, Arch. Biochem. Biophys., *98*, 191 (1962).
22. B. Foltman, in *Methods in Enzymology* (S. Colowick, N. Kaplan), vol. XIX, p. 421 (1970).
23. V.V. Korsunov, Mikrobiol., *38*, 238 (1969),
24. R.C. Kamm, A. G. Smith, H. Lyons, Anal Biochem., *37*, 333 (1970).

25. F. Egami, K. Takahashi, T. Uchida, in Progr. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol. editori J. N. Davidson, W. E. Cohn, vol. 3, Academic Press, 1964, p. 59.
26. O. A. Stamm, Helv. Chim. Acta, *46*, 3008 (1963).
27. B. Hagihara, in *The Enzymes*, ed. II, vol. 4, Academic Press, 1960, p. 193.
28. M. Kato, Y. Ikeda, J. Biochem., *64*, 321 (1968).
29. N.B. Kurnick, Jour Gen Phasiol, *33*, 243 (1949).
30. J.A. Armstrong, Exptl. Cell. Res., *11*, 640 (1956).
31. * * * A guide to practical histochemistry, Oliver, Boyd, Edinburgh, 1969, p. 102.
32. S. Vasu, St. Hulea, S. Rădulescu, Rev. Roum. Biochim, *8*, 351 (1971).
33. S. Vasu, St. cercet. Inframicrobiol., *22*, 563 (1971).
34. W. W. Reid, Nature, *166*, 569 (1950).
35. C.W. Nagel, R. H. Wanghn, Arch. Biochem. Biophys., *93*, 344 (1961).
36. S. Vasu, Rev. Roum, Biochim., *11*, 211 (1974).
37. H.Steym, Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem, *348*, 951 (1967).
38. S. Vasu, St. cerc. biochim., *6*, 71 (1963).
39. S. Vasu, Rev. Roum, Biochim., *4*, 67 (1967).
40. M. Suguria, H. Tanaka, S. Kato, K. Nagaro, M. Doke, Yakuzayaku *26*, 69 (1966), în Chem. Abstr., *69*, 8356 (1966).
41. A. Korkulanin, D. Hrasak, V. Jchanides, Mikrobiologia, 5, 163 (1968).
42. G. J. Hojny, E. T. Reese în *Cellulases and their applications*, ACS, Washington, 1961, p. 393.
43. G. Petterson, J. Porath, în *Methods in enzymology* (ed. L. Collowick și N. Kaplan),vol. VIII, 1966, p. 603.
44. H. Rinderknecht, P. Wilding, B. Haverback, Experientia, 23, 805 (1967).
45. J.S. Huang, J. Tang, Anal Biochem., 73, 369 (1976).
46. G. G. Guilbault in *Enzymatic methods of analysis*, Pergamon, 1970, p. 7.
47. F. Aladjem, M. T. Palmiter, J. Theor. Biol., *33*, 339 (1965).
48. J. R. Cann, Immunochem, *12*, 473 (1975).
49. C.B. Laurell, Anal. Biochem., *15*, (1966).
50. C. de Lisi, G. I. Bell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *71*, 16 (1974).
51. B. Goldstein, C. de Lisi, J. Abate, J. Theor. Biol., *52*, 317, (1975).
52. C. De Lisi in *Antibody Interactions* Springer, 1975, p. 47.
53. E. Weiler, E. W. Melletz, E. Breuninger—Peck, Proc. Natl. Acad. Sci., USA *54*, 1310 (1965).
54. R.N. Hiramoto, J. R. Mc. Ghee, D. C. Hurst, N. M. Hamlin, Immunochem., 7, 972 (1970).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 223–229, (1977)

ELABORAREA ŞI CARACTERIZAREA UNOR PREPARATE ENZIMATICE INSOLUBILE APLICABILE ÎN ANALIZA ŞI EPURAREA APELOR UZATE

H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, IRINA CORNOIU, TR. BENŢIA

Rezumat. — Se descriu proprietăţile fizico-chimice şi cinetice ale peroxidazei şi β-amilazei, imobilizate prin legarea lor covalentă de agaroză activată de BrCN, de CH- şi AH-Sepharose 4 B, precum şi cele ale peroxidazei şi catalazei legate de celuloza activată cu BrCN. Preparatele obţinute prezintă proprietăţi catalitice şi mecanice care permit utilizarea lor în analiza şi epurarea apelor uzate. Prin imobilizare, enzimele studiate nu-şi modifică pH-ul optim de acţiune şi îşi păstrează aceeaşi afinitate faţă de substrat. Preparatele obţinute rămîn catalitic active şi după numeroase refolosiri, ceea ce deschide perspective de utilizarea lor în sisteme enzimatice automatizate, cu funcţionare în flux continuu.

Enzimelor insolubilizate obţinute prin fixare pe suporturi insolubile li se acordă în ultima vreme o importanţă tot mai mare datorită multiplelor lor posibilităţi de folosire nu numai în cercetarea ştiinţifică fundamentală, ci şi în diferitele ramuri ale practicii, ca de pildă, în industria alimentară şi farmaceutică, în chimia organică preparativă, în chimia analitică şi medicală etc. (1) (2) (3). Principalul avantaj al enzimelor insolubilizate, faţă de cele solubile, constă mai ales în posibilitatea refolosirii lor repetate. Enzimele insolubilizate sînt totodată mai stabile în soluţii apoase, în comparaţie cu cele libere, sînt mai puţin sensibile la variaţii de pH şi de temperatură, iar cele proteolitice devin rezistente la autoproteoliză în urma legării lor de suporturi insolubile (4) (5).

Toate aceste proprietăţi deschid perspective interesante de folosire a enzimelor insolubilizate şi în analiza şi controlul calităţii apelor poluate, precum şi în depoluarea lor biologică. Astfel, datorită selectivităţii pronunţate a reacţiilor enzimatice, bazate pe marea specificitate a enzimelor, cuplată totodată şi cu o sensibilitate remarcabilă, enzimele pot fi folosite — mai ales în starea lor insolubilizată — ca sensori specifici în detectarea selectivă a diferiţilor agenţi poluanţi din ape, cum sînt pesticidele organofosforice şi organo-clorurate şi o serie de anioni şi cationi extrem de toxici prezenţi chiar şi sub forme de urme. Astfel, inhibiţia puternică a colinesterazei produsă de pesticidele organo-fosforice permite utilizarea enzimei la determinarea cantitativă a acestora (6), iar lipazele fiind sensibile la acţiunea inhibitorilor hidrofobi pot fi folosite în detectarea şi dozarea compuşilor organo-cloruraţi. Pe de altă parte, s-a apelat la enzime şi pentru depoluarea biologică a apelor uzate. La început enzimele au fost adăugate ca atare nămolului activ fără a obţine însă rezultate satisfăcătoare întrucît ele au fost repede distruse sub acţiunea nămolului activ. Mai tîrziu, s-a reluat folosirea lor în epurare fie în faza preliminară a acesteia, fie chiar în locul epurării biologice efectuate cu microorganis-

mele din nămolul activ. Un exemplu de folosire cu succes a enzimelor într-o fază preliminară a epurării biologice propriu-zise, îl constituie de pildă, tratarea cu amilaze a apelor uzate încărcate cu amidon, fapt care duce la o scădere a turbidităţii şi o creştere a vitezei de sedimentare a suspensiilor datorită scindării prin hidroliză a macromoleculelor amidonului.

Utilizarea enzimelor ca atare în analiza şi epurarea apelor uzate prezintă totuşi unele dezavantaje legate mai ales de preţul de cost relativ ridicat al acestora, precum şi de instabilitatea lor pe perioade mai mari de timp. Aceste dezavantaje se elimină însă în mare măsură prin fixarea enzimelor pe suporturi insolubile, fapt ce permite utilizarea lor de repetate ori fie în urma îndepărtării lor din mediu de reacţie, fie prin încărcarea lor în coloane enzimatice în flux continuu care permit automatizarea proceselor de epurare şi control. Prin imobilizare enzimele îşi păstrează practic aceeaşi afinitate pentru substrat, nu-şi modifică în general pH-ul lor optim de acţiune şi îşi menţin aceeaşi activitate pe perioade relativ lungi de timp. În tabela 1 sînt prezentate cîteva din enzimele cu posibilităţi de utilizare în analiza şi epurarea apelor uzate.

Tabela 1

Exemple de utilizări ale enzimelor în analiza şi epurarea apelor uzate

Enzima	Domeniu de aplicare
Colinesteraze	Determinarea pesticidelor organo-fosforice
Lipaze	Determinarea pesticidelor organo-clorurate
Fosfataza alcalină	Determinarea aldrinului
Anhidraza carbonică	Determinarea DDT
Catalaza şi colinesteraza	Determinarea compuşilor organo-arsenici
α-amilază, β-amilază şi glucoamilază	Epurarea apelor uzate ce conţin amidon şi dextrine (produşi de reacţie cu moleculă mică : maltoză, dextrine, glucoză)
Fenoloxidaze	Preepurarea apelor uzate ce conţin fenol şi derivaţii lui
Depolimeraze	Preepurarea apelor uzate ce conţin răşini polivinilice

În lucrarea de faţă se descriu proprietăţile fizico-chimice şi cinetice ale peroxidazei şi β-amilazei insolubilizate prin legarea lor de agaroză activată cu BrCN, de CH- şi AH-Sepharose 4B, cele ale peroxidazei şi catalazei legată de celuloză activată cu BrCN şi, în sfîrşit, cele ale colinesterazei legate de CH- şi AH-Sepharose 4 B. Ne-am oprit asupra peroxidazei şi amilazei întrucît au perspective multiple de aplicare în depoluarea biologică a apelor uzate, iar asupra catalazei, peroxidazei şi colinesterazei deoarece pot servi ca sensori enzimatici specifici pentru identificarea de pesticide şi a altor componente toxice din ape poluate.

Procedeele folosite la obţinerea de enzime insolubilizate. Dintre numeroasele metode utilizate la obţinerea de preparate enzimatice insolubile am folosit în lucrările noastre procedeul care se bazează pe legarea cova-

lentă a enzimei de un suport macromolecular organic insolubil adecvat, cum este agaroza și derivații de sinteză ai ei sau celuloza. Acest procedeu se caracterizează prin condiții blînde de reacții ce nu afectează enzima în timpul cuplării ei de suport (temperatura camerei, pH-ul mediului de reacție în apropierea punctului de neutralitate etc.), și duce la preparate enzimatice insolubile din care nu se eliberează enzima odată legată nici la variații mari de pH și nici la concentrații ionice ridicate cum este cazul la preparatele obținute prin simpla adsorbție a enzimelor de suporturi insolubile, legarea lor electrovalentă de schimbători de ioni sau prin înglobarea mecanică în diferite tipuri de gel.

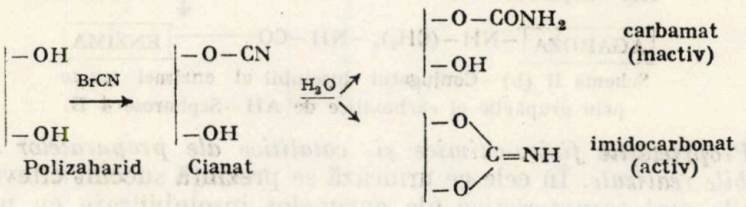
Procedeul de legare covalentă a enzimelor direct de molecula agarozei sau celulozei comportă două faze și anume:

1. Activarea gelului perlat de agaroză (7) sau a pulberii de celuloză cu BrCN care are drept scop introducerea de grupări active în molecula acestor polizaharide, necesare pentru legarea ulterioară a enzimelor.
2. Cuplarea enzimelor de polizaharidul activat care este un proces atît de blînd încît nu se repercutează asupra proprietăților biologice și catalitice ale enzimelor cuplate.

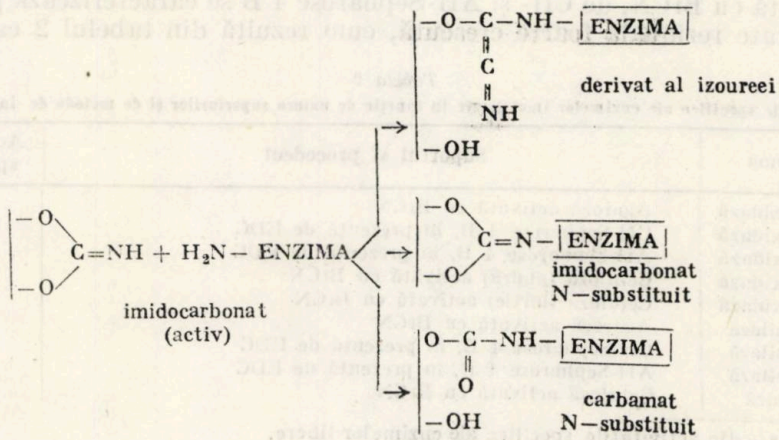
Reațiile chimice care au loc în cursul procesului de activare a moleculei polizaharidului cu BrCN și apoi la cuplarea enzimelor de polimerul activat au fost studiate de Axén și col. (8) și sînt prezentate în schema I.

Schema I — Reacția de cuplare a enzimelor de polizaharide activate cu BrCN.

Faza de activare:

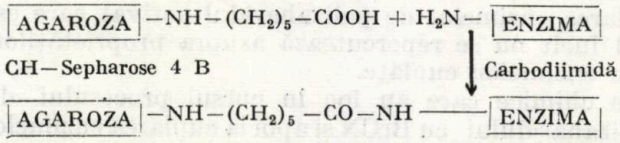


Faza de cuplare:

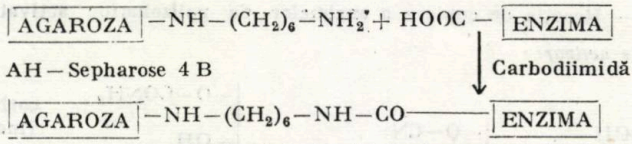


Folosirea derivaţilor agarozei de tipul CH- şi AH-Sepharose 4 B duce de asemenea la preparate enzimatice insolubile obţinute prin legarea covalentă a enzimelor de aceste suporturi. Aceste două produse de sinteză a agarozei permit pe lîngă studierea influenţei unor factori sterici — prin posibilitatea îndepărtării enzimei de matricea suportului cu ajutorul unor braţe hexametilenice — şi studierea influenţei pe care o are modul în care se leagă enzima de suport asupra activităţii catalitice, adică dacă enzima se fixează prin intermediul grupărilor ei aminice libere sau carboxilice libere de macromolecula suportului insolubil. Reacţia de cuplare are loc în prezenţă de clorhidrat de 1-etil-3,3-dimetilaminopropil-carbodiimidă (EDC), şi este redată în schema II, a, b.

Schema II — Conjugatul insolubil al enzimei legate prin grupările ei aminice de CH-Sepharose 4 B (a) şi cel obţinut la legarea enzimei prin grupările ei carboxilice de AH-Sepharose 4 B (b).



Schema II (a) — Conjugatul insolubil al enzimei legate prin grupările ei aminice de CH—Sepharose 4 B.



Schema II (b) — Conjugatul insolubil al enzimei legate prin grupările ei carboxilice de AH—Sepharose 4 B.

Proprietăţile fizico-chimice şi catalitice ale preparatelor enzimatice insolubile realizate. În cele ce urmează se prezintă succint cîteva din proprietăţile mai caracteristice ale enzimelor insolubilizate cu perspective de aplicare în controlul şi depoluarea apelor uzate.

Astfel, preparatele peroxidazei obţinute prin cuplarea ei de agaroză activată cu BrCN, de CH- şi AH-Sepharose 4 B se caracterizează printr-o activitate reziduală foarte crescută, cum rezultă din tabelul 2 care este

Tabela 2

Activităţile specifice ale enzimelor imobilizate în funcţie de natura suporturilor şi de metoda de insolubilizare

Enzima	Suportul şi procedeul	Activitate specifică*
Peroxidază	Agaroză activată cu BrCN	90%
Peroxidază	CH-Sepharose 4 B, în prezenţă de EDC	60%
Peroxidază	AH-Sepharose 4 B, în prezenţă de EDC	78%
Peroxidază	Celuloză (pudră) activată cu BrCN	32%
Peroxidază	Celuloză (hîrtie) activată cu BrCN	8%
β-Amilază	Agaroză activată cu BrCN	7%
β-Amilază	CH-Sepharose 4 B, în prezenţă de EDC	33%
β-Amilază	AH-Sepharose 4 B, în prezenţă de EDC	36%
Catalază	Celuloză activată cu BrCN	22%

* % din activităţile specifice ale enzimelor libere.

cuprinsă între 60—90% (9) (10). Folosindu-se însă celuloză ca suport insolubil activitățile reziduale sînt considerabil mai scăzute (11).

În ambele cazuri însă peroxidaza nu-și modifică pH-ul ei optim de acțiune în urma fixării covalente de suporturi insolubile (fig. 1, 2).

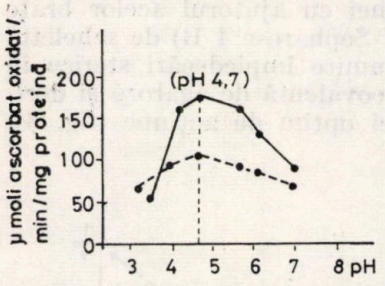


Fig. 1. — Influența pH-ului asupra activității enzimatice a peroxidazei libere (●—●) și insolubilizate (●--●) prin legarea covalentă de CH-Sepharose 4 B.

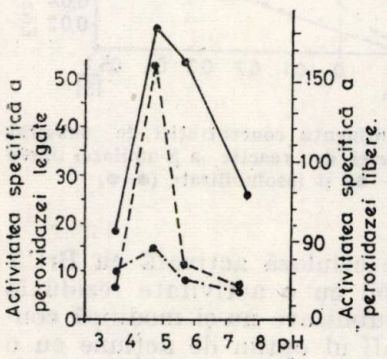


Fig. 2. — Influența pH-ului asupra activității enzimatice a peroxidazei libere (●—●) și insolubilizate (●--●) prin legare covalentă de celuloză granulată și hîrtie (●···●) activată cu BrCN.

Folosind ca suport la cuplarea peroxidazei AH-Sepharose 4 B, se obține un preparat al cărei activitate enzimatică specifică este cu aproximativ 18% mai ridicată (143 µM ascorbat/min/mg proteină) decît în cazul folosirii de CH-Sepharose 4 B. Această diferență de activitate enzimatică specifică s-ar putea datora unei afinități mai mari a peroxidazei pentru AH-Sepharose 4 B, în comparație cu restul proteinelor prezente în preparatul parțial purificat de peroxidază, legătura cu suportul insolubil realizîndu-se prin intermediul grupărilor carboxilice libere ale enzimei (tabelul 3).

În sprijinul acestei afirmații vine numărul mult mai mare de grupări carboxilice libere în comparație cu cel al grupărilor aminice din molecula peroxidazei, care se oglindește clar și în compoziția în aminoacizi a peroxidazei (acid aspartic 14,4—16,8 g/100 g proteină și acid glutamic 6,2—9,3 g/100 g proteină, în comparație cu un conținut de lizină de numai 1,8—2,8g/100 g proteină și de histidină de 1—1,3 g/100 g proteină (12).

Conținutul diferit în proteină de 10,2 mg și respectiv 4,7 mg proteină/ml al preparatelor enzimatice insolubile obținute se datorește numărului diferit al grupărilor active din molecula suporturilor respective (tabela 3).

Tabela 3

Activitățile enzimatice ale peroxidazei libere și legate de CH— și AH—Sepharose 4 B

Starea peroxidazei	Concentrația proteică (mg/ml)	Activitatea enzimatică (µM ascorbat oxidat/min/ml)	Activitatea specifică (µM ascorbat oxidat/min/mg proteină)	Activitate specifică raportată la enzima liberă (%)
Enzimă liberă	16	2880	180	100
Enzimă legată de CH-Sepharose 4 B (capacitatea suportului = 10—14 µmoli/ml gel)	10,2	1110	109	60,6
Enzimă legată de AH-Sepharose 4 B (capacitatea suportului = 6—10 µmoli/ml gel)	4,7	672	143	78,1

În cazul β-amilazei preparatele enzimatice insolubile obţinute sînt catalitic active, activitatea reziduală fiind în funcţie de suportul folosit (13). Enzima avînd o greutate moleculară relativ crescută, de asemenea şi substratul asupra căruia acţionează, se observă în acest caz un efect favorabil prin îndepărtarea moleculei enzimei cu ajutorul acelor braţe hexametilenice (în cazul folosirii CH- şi AH-Sepharose 4 B) de scheletul macromoleculei suport, prevenind astfel anumite împiedecări sterice în interacţiunea enzimă-substrat. Prin legarea covalentă de agaroză şi derivaţii săi, β-amilaza nu-şi modifică pH-ul ei optim de acţiune (fig. 3), şi nici afinitatea ei faţă de substrat (fig. 4).

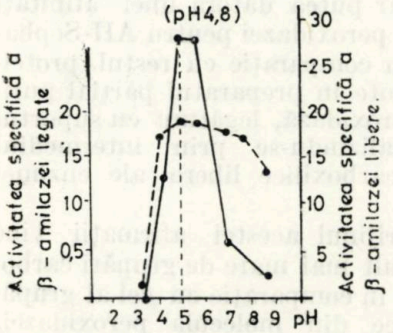


Fig. 3. — Influenţa pH-ului asupra activităţii enzimatice a β-amilazei libere (●—●) şi insolubilizate (●--●) prin legare de CH-Sepharose 4 B.

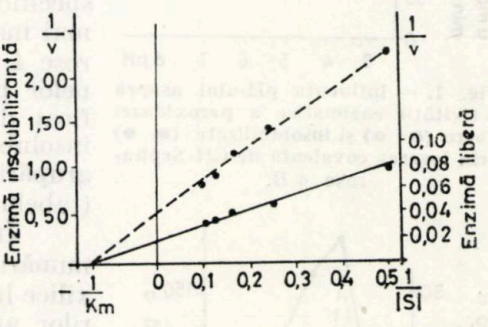


Fig. 4. — Influenţa concentraţiei de substrat asupra vitezei de reacţie a β-amilazei libere (●—●) şi insolubilizate (●--●)

Prin legarea covalentă a catalazei de celuloză activată cu BrCN (14) se obţine un produs enzimatic insolubil cu o activitate reziduală de 22% (vezi tabela 2). Catalaza prin insolubilizare nu-şi modifică constanta Michaelis (fig. 5) dar îşi schimbă pH-ul optim de acţiune cu o unitate spre domeniul alcalin (fig. 6).

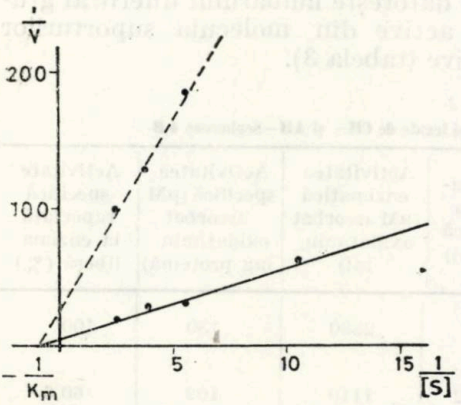


Fig. 5. — Influenţa concentraţiei de substrat asupra vitezei de reacţie a catalazei libere (●—●) şi imobilizate (●--●)

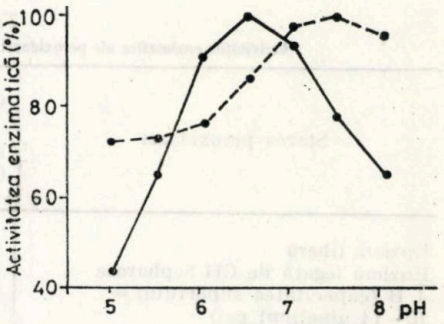


Fig. 6. — Influenţa pH-ului asupra catalazei libere (●—●) şi insolubilizate (●--●)

În sfîrșit, prin legarea covalentă a colinesterazei de CH- și AH-Sepharose 4 B, am obținut preparate enzimatice cu activități reziduale suficient de ridicate pentru a putea fi folosite la elaborarea de sensori enzimatici pentru detectarea selectivă a pesticidelor organo-fosforice din ape poluate.

Preparatele enzimatice amintite mai sus posedă proprietăți fizico-chimice și mecanice foarte bune, își păstrează activitatea lor catalitică timp îndelungat și după numeroase refolosiri, sînt mai puțin sensibile la variațiile de pH ale mediului, iar testele efectuate cu ele pînă în prezent în controlul și depoluarea biologică a apelor uzate sînt promițătoare și în curs de aprofundare în colaborare cu I.C.P.G.A. București.

Prezentat la redacție
la 24 iunie 1977

Institutul de Științe Biologice,
București
Colectivul de Enzimologie

BIBLIOGRAFIE

1. J. Gryszkiewicz, Folia Biologica, *19*, 119 (1971).
2. G.J.H. Melrose, Rev. Pure Appl. Chem. *21*, 83 (1971).
3. H.D. Orth, W. Brummer, Angew. Chemie, *84*, 319 (1972).
4. D. Gabel, B. V. Hofsten, Eur. J. Biochem., *15*, 410 (1970).
5. H.D. Schell, F. Ionescu—Stoian, St. cerc. biochim., *16*, 203 (1973).
6. T.J. Davis, G. W. Maloney, Water and Sewage Works, July, 1967.
7. S. Hjerten, Biochim. Biophys. Acta, *79*, 393 (1968).
8. R. Axèn, J. Porath, S. Ernback, Nature, *214*, 1302 (1967).
9. H.D. Schell, A. Turcu, M.A. Mateescu, Rev. roum. Biochim, *10*, 233 (1973).
10. H.D. Schell, M.A. Mateescu, Acta Biol. Med. Germ., *34*, 959 (1975).
11. H.D. Schell, A. Turcu, M. Pele, Cellulose Chem. Technol., *9*, 205 (1975).
12. L.M. Shanon, E. Kay, J. L. Lew, J. Biol. Chem., *241*, 2166 (1966).
13. H.D. Schell, I. Cornoiu, M. A. Mateescu, Rev. roum. Biochim., *11*, 199 (1974).
14. H.D. Schell, A. Turcu, M. Pele, Cellulose Chem. Technol., *10*, 241 (1976).

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE, 20, 2, 231—239, (1977)

RECENZII

Current Topics in Microbiology and Immunology (Expuneri curente în Microbiologie şi Imunologie) nr. 72, ed. Springer-Verlag Berlin — Heidelberg—New-York, 1975, 196 pag.

Volumul conţine 5 capitole. Fiecare capitol se sfîrşeşte cu o bogată listă bibliografică.

Primul capitol tratează despre diviziunea celulei şi replicarea DNA în culturile Synchron Tetrahymena. Se descrie inducţia diviziunii celulare cu ajutorul şocurilor termice, şi o serie de alte metode cu privire la aceasta. Se analizează efectul 5 bromodeoxyuridinei asupra sintezei de DNA şi RNA la Tetrahymena.

În al doilea capitol se face expunerea factorilor umorali care interferă cu imunitatea mediată celular : factorii blocanţi (anticorpi, complexe antigen-anticorpi) şi factorii inhibitori. În final se insistă asupra rolului factorilor umorali în modificarea reacţiilor imune de rejecţie tumorală.

În al treilea capitol se prezintă o serie de noţiuni cu privire la inhibitorii celulelor T. Astfel se arată teoria clasică a toleranţei, rolul sistemelor supresoare, clasificarea sistemelor supresoare, contactul şi reacţiile hipersensibilităţii întîrziate, caracteristicile celulelor supresoare (proprietăţi fizice, efectul thymectomiei, sensibilitatea la droguri). Modul de acţiune a celulelor supresoare precum şi modul de acţiune al factorilor specifici T încheie acest capitol.

În capitolul patru se prezintă infecţia încetă cauzată la om de către virusul Vesna (aspecte clinice şi patologice, natura proceselor infecţioase, implicarea transcripţiei reverse, origina şi taxonomia).

În al cincilea capitol se face prezentarea transferului imunităţii antitumorale de către RNA imun. Interesantă este încheierea acestui capitol în care se dau o serie de încercări clinice de început ale imunoterapiei cu RNA imun.

Cartea se încheie cu un index de subiecte.

Din cele relatate se observă că această carte este deosebit de utilă medicilor, biochimiştilor, imunologilor şi microbiologilor.

Lucia Buzilă

Environmental N-nitroso Compounds Analysis and Formation (Analiza şi formarea compuşilor N-nitrozo din mediu), ed. E.A. Walker, P. Bogovschi, L. Griciute, editor tehnic : W. Davis, IARC Scientific Publications nr. 14, Lyon, 1976, 512 p.

Volumul însumează lucrările prezentate în cadrul simpozionului cu aceeaşi temă care a avut loc la 1—3 octombrie 1975 la Tallin, R.S.S. Estonă. Interesul şi acuitatea studiului compuşilor N-nitrozo este determinat de larga lor răspîndire în mediul nostru de viaţă şi de potenţele cancerogene ale acestor substanţe, pentru toate speciile de animale cercetate. Pentru om, unii din aceşti agenţi determină boli cronice — chiar atunci cînd se găsesc în doză redusă — astfel că evaluarea riscului apariţiei cancerului este o problemă dificilă, ce implică o abordare multidisciplinară.

Cele patru părţi ale volumului grupează metodele analitice de identificare a acestor compuşi, formarea şi apariţia lor precum şi alte studii efectuate asupra compuşilor N-nitrozo. Spectrometria de masă, cromatografia în mediu lichid, sisteme de gaz cromatografie — spectrometrie de masă etc., sînt numai cîteva din tehnicile de identificare a acestor compuşi nevolatili sau volatili. Sînt expuse metode de determinare a urmelor acestor compuşi în alimente, în atmosfera laboratoarelor, în carne şi produse de carne.

Partea a doua a cărţii include lucrări asupra modului de formare a compuşilor N-nitrozo, mai ales prin nitrozilarea unor grupări aminice. Unele substanţe ca taninuri, etilenă, complecşi metalici şi vitamine sînt însă inhibitori ai reacţiei de nitrozilare. Cercetările realizate au arătat astfel că acidul ascorbic este cel mai eficient inhibitor al nitrozilării, atît în vitro cît şi în vivo.

Apariţia compuşilor N-nitrozo în fumul de ţigară, în unele produse de carne, în uleiul fasolei soia, în hrana animalelor, în aer şi apă este relevată de cercetările cuprinse în partea a treia a cărţii.

Ultima parte cuprinde studii diverse asupra acestor compuşi ca de exemplu : mutagenicitatea şi carcinogenicitatea derivaţilor N-nitrozo ai insecticidelor pe bază de carba-

maţi, degradarea nitrozaminelor prin fotoliză, interacţia nitriţilor cu hemul şi compuşii similari etc. Un scurt rezumat al volumului inclus în ultimile pagini şi recomandările finale făcute în cadrul respectivului simpozion atrag încă odată atenţia asupra importanţei şi necesităţii studiului acestor compuşi.

Volumul este deosebit de util medicilor, biochimiştilor, biologilor şi agronomilor.

Lucia Doina Popov

INSERM Symposium Series vol. 52, IARC Scientific Publications nr. 13, *Environmental Pollution and Carcinogenic risks* (Poluarea mediului şi riscul cancerizării), ed. C. Rosenfield, W. Davis, 196, 473 p.

În deschiderea cărţii de faţă este prezentat un referat general asupra importanţei factorilor de mediu în cancer.

Cuprinsul este ordonat în 8 capitole: primul, poluarea atmosferică, include cercetări asupra rolului unor factori de mediu (fire de cărbune, gaze industriale şi de motor, benzo(a) pyren, NO, componenţi-SH reactivi) în acest proces, alături de penetrarea compuşilor cancerigeni prin căile respiratorii. În capitolul *„Poluarea apelor"* sînt cuprinse lucrări asupra substanţelor cancerigene din estuare şi riscurile pe care acestea le prezintă pentru om. Al treilea capitol *„Poluarea de origine profesională"* include cercetări privind cancerul produs de asbest, etilene clorurate, hidrocarburi policiclice aromate, metabolismul clorurei de vinil marcate cu ^{14}C în vivo şi în vitro. Un alt factor de poluare, radiaţiile, a fost luat în studiu în cercetări dintre care menţionăm cele efectuate în corelaţie cu normele de securitate şi nivelele actuale de expunere în scopul prevenirii riscurilor de cancerizare prin aceşti agenţi. Un alt capitol, identificarea substanţelor cancerigene, înmănunchează cîteva cercetări asupra cancerogenezei chimice în culturile de ţesuturi, asupra extrapolării rezultatelor testelor efectuate la om, asupra mutagenicităţii şi cancerogenicităţii coloranţilor părului şi constituenţilor lor etc. De o deosebită valoare sînt aspectele de evaluare a riscului de cancerizare, de măsurare a potenţialităţilor cancerigene ale mediului şi aspectele industriale şi juridice ale cancerului profesional.

Prin valoarea şi semnificaţia lucrărilor cuprinse în acest volum, prin acuitatea subiectului, cartea de faţă constituie o literatură de specialitate şi un îndumar practic valoros pentru înlăturarea acestui risc al societăţii contemporane.

Lucia Doina Popov

Acta histochemica, Supplementband XVI, *Standardisierung und Objektivierung histochemischer Befunde* (Standardizarea şi obiectivizarea descoperirilor histochimice), ed. Ch. Pilgrim, VEB Gustav-Fischer, Verlag, Jena, 1976, 179 fig., 37 tabele.

Volumul cuprinde lucrările prezentate la cel de al XVII-lea Simpozion al Societăţii de histochimie (2—5 octombrie, 1974). În deschiderea cărţii este prezentat un referat general asupra colorării vitale cu roşu neutru a lizozomilor şi a altor organite celulare. În continuare sînt expuse lucrările prezentate la 4 mese rotunde avînd drept tematică: autoradiografia cantitativă, citofotometria de impulsuri, histomorfometria şi ritmurile circadiene. Fiecare din aceste subcapitole include 1—2 referate generale şi comunicările ştiinţifice originale aferente tematicii. Dintre referate menţionăm: Importanţa autoradiografiei cantitative pentru cercetările de cinetică celulară, principiile, posibilităţile de folosire şi limitele morfometriei, cronobiologia şi implicaţiile ei în cercetarea fundamentală.

Cartea include 21 de note de laborator privind aspecte ale cercetărilor histochimice esenţiale pentru practica medicală şi biologică curentă. Unele dintre acestea se referă la numărul, reactivitatea şi funcţia grupărilor -SH, la determinarea absolută a grupărilor -SH ale proteinelor, precum şi la evidenţierea histochimică a acestor grupări. Alte lucrări privesc histochimia glicogenului, estimarea activităţilor hidrolazice în secţiunile histochimice, localizarea unor amidaze, microfotometria proteinelor nucleare şi RNA-ului, analize histochimice pe material vegetal etc.

Ultimile pagini ale cărții cuprind lista participanților la Simpozion. Alături de valoarea teoretică și practică a rezultatelor expuse, ilustrațiile grafice, planșele și diagramele aferente contribuie la alcătuirea unei bibliografii de înaltă ținută, utilă medicilor de laborator, biologilor și chimiștilor.

Lucia Doina Popov

G. BUTSCHAK, *Biochemische Grundlagen der Teilung und Differenzierung von Normal— und Tumorzellen* (Bazele biochimice ale diviziunii și diferențierii celulelor normale și tumorale), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 40 fig., 4 planșe, 3 tabele, 348 p., 1976.

Deși problemele creșterii și diferențierii constituie domenii de bază ale cercetării biologice, cunoștințele actuale asupra bazelor biochimice ale acestor procese sînt încă reduse. Meritul monografiei de față constă tocmai în aceea că sumarizează literatura asupra bazelor biochimice ale proceselor de creștere și diferențiere prezentînd totodată un mijloc rapid de informare asupra stadiului cercetărilor din acest domeniu.

Cele 4 capitole principale ale cărții sînt grupate astfel: *Reglarea expresiei genetice la microorganisme*; *Bazele biochimice ale diviziunii celulare*; *Bazele biochimice ale diferențierii celulare* și *Reglarea proceselor de diviziune și diferențiere în celulele tumorale*. Capitolul al doilea cuprinde: *Replicarea DNA și Diviziunea celulară în celulele pro- și eucariote*; *Reglarea diviziunii celulare al animalele superioare*; *Importanța hormonilor pentru reglarea proceselor de creștere*; *Inhibitorii specifici de țesut ai diviziunii celulare*. Din cuprinsul capitolul 3 spicuim: *Procese de diferențiere la celule bacteriene și la microorganismele eucariote*; *Interrelații specifice între celulele organismelor superioare*; *Dezvoltarea și diferențierea organismelor superioare*; *Mecanismul molecular al diferențierii celulare*; *Unele considerații asupra mecanismului diferențierii și diviziunii celulare*. Ultimul capitol al cărții cuprinde date asupra formării celulelor canceroase și proprietăților acestora, asupra stabilității stării maligne și posibilităților de influențare a creșterii și diferențierii celulelor canceroase cu ajutorul factorilor de reglare biologică.

Prezentarea sistematică a cuprinsului, includerea unui scurt rezumat la sfîrșitul fiecărei părți mai deosebite a cărții, indicațiile bibliografice exhaustive ca și întreaga ilustrație grafică ajută cititorului — biolog, biochimist sau medic — în însușirea rapidă și deosebit de eficientă a domeniului studiat.

Lucia Doina Popov

W. BERGMANN, *Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen in Farbbildern* (Tulburări de nutriție la plantele de cultură, redate în imagini color), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976, 183 p., 519 fotografii, color în 160 planșe.

Volumul de față constituie un ajutor practic efectiv în munca fiziologilor vegetali și agronomilor pentru identificarea — pe cale vizuală — a tulburărilor de nutriție ale plantelor de cultură. Numeroasele ilustrații în culori expun simptomele specifice ale unui număr mare de specii în condițiile lipsei sau excesului unor elemente necesare creșterii plantelor ca: N, P, Mg, K, Zn, Mn, Fe, S, Cu, Ca, B, Mo. Cartea indică totodată nivelul la care este afectat metabolismul vegetal ca urmare a lipsei sau excesului unui element. Astfel, unele simptome se recunosc la nivelul frunzei, altele la cel al fructului, țesuturilor de rezervă, florilor etc. sau sînt influențe ce afectează metabolismul general al plantei, determinînd modificări radicale în aspectul acesteia.

Accesibilitatea volumului este crescută și de explicațiile trilingve ale ilustrațiilor (germană, rusă și engleză) de o deosebită calitate și acurateță.

Lucia Doina Popov

W. FUCHS-KITTOWSKI, *Probleme des Determinismus und der Kybernetik in der molekularen Biologie. Tatsachen und Hypothesen über das Verhältnis des technischen Automaten zum lebenden Organismus.* (Problemele determinismului și ciberneticii în biologia moleculară, Fapte și ipoteze asupra raportului dintre automatele tehnice și organismul viu), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1976, 31 fig., 491 p.

Volumul cuprinde 11 capitole grupate în două părți. Prima, tratează problema determinismului și relația dintre automatele tehnice și organismul viu. Autorul prezintă în acest context raportul dialectic structură-funcție, relația dintre fizică și biologie în lumina cunoștințelor actuale unele probleme legate de teoriile subiectiviste și agnostice manifestate în fizică și biologie precum și combaterea acestora. În subcapitole aparte sînt prezentate aspecte ale determinismului în sistemele tehnice și cele vii și raportul dialectic dintre necesitate și întîmplare.

Cea de-a doua parte a volumului privește celula ca sistem cibernetic ocupîndu-se de problemele determinismului și reglării în celule izolate și în evoluția organismului. La un înalt nivel științific sînt prezentate bazele moleculare ale stocării și transmiterii de informație, insistînd asupra stocării informației în moleculele de DNA, asupra replicării genetice și mecanismelor de transport ale informației. Un alt capitol tratează mecanismele teleonomice ale metabolismului celular (autoreglarea, inhibiția feed-back, inducția și represia sintezei proteinelor, problema eficienței în concepția cibernetică). În paginile următoare este prezentată reflectarea cibernetică și biologică a relațiilor reciproce dintre ereditate și metabolism. Un alt capitol se referă la evoluția ca proces de optimizare, la dezvoltare și teoria sistemelor deschise, la raportul dialectic dintre întreg și părțile sale componente, la necesitatea evoluției etc. Ultimul capitol al cărții cuprinde un rezumat al principalelor probleme, idei și concepte dezvoltate pe parcursul volumului.

Diagramele și tabelele ilustrative completează adecvat un volum interesant atît pentru biologi cît și pentru filozofi. Larga informare bibliografică (191 indicații cuprinzînd și titlurile articolelor) contribuie la succesul acestei cărți.

Lucia Doina Popov

Cancer incidence in five continents (Incidența cancerului în cele cinci continente) Volume III. J. Waterhouse, C. Muir, P. Correa & J. Powell, eds. IARC Scientific Publications No. 15 International Agency for Research on Cancer, Lyon 1976, 594 pp.

Acest volum a apărut ca urmare a colaborării IARC cu International Association on Cancer Registries și își propune, în principal, să prezinte incidența cancerului în diferite părți ale lumii, în funcție de vîrstă, sex, grup etnic etc.

În afară de prezentarea instrumentelor de lucru în ceea ce privește înregistrarea cazurilor, clasificarea lor, maniera de prelucrare a datelor — în capitolele introductive se stabilește și o corespondență utilă cu tabele echivalente editate în 1955 și 1965 de către Organizația Mondială a Sănătății (International Statistical Classification of Diseases, Injuries and Causes of Death — ICD). Se fac delimitările respective între cazurile verificate histologic și cele mortale, deduse numai din certificatele medicale eliberate.

În volum se propune, de asemenea, introducerea unei noi unități de estimare a incidenței cancerului, în funcție de vîrstă, „the cumulative rate", ca avînd mai multe avantaje față de sistemele actuale.

Vl. Gheordunescu

Lecture Notes in Biomathematics (Note de lectură în biomatematică); vol. 10; John J. Tyson THE BELOUSOV-ZHABOTINSKII REACTION (Reacția Belousov-Jabotinski), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 128 p.

Oscilația de mare precizie între două stări limită a reacției de oxidare a acidului citric de către bromat, în prezența ionilor de ceriu, descoperită de Belousov în 1958 și descrisă de Jabotinski în 1964 a trezit interesul multor cercetători.

Deși asemenea oscilații sînt puțin cunoscute în sistemele chimice, ele prezintă asemănări foarte mari cu unele procese biologice (agregarea acrasiomicetelor, creșterea fungilor, fibrilația

miocardului), biofizice (propagarea potențialelor de acțiune) și biochimice (glicoliza). Reacția Belousov-Jabotinski (BZ) a trezit și interesul matematicienilor, ca un nou domeniu de aplicare a metodelor moderne de analiză a ecuațiilor diferențiale. Rezolvarea matematică a reacției BZ, ar putea fi extinsă și la unele din procesele biologice menționate, cu condiția ca mecanismele biologice respective să poată fi formulate în termenii ecuațiilor diferențiale ordinare și parțiale. Inginerii chimiști sînt de asemenea interesați în reacția BZ, întrucît în proiectarea reactoarelor chimice trebuie să țină seama de instabilitatea chimică, comportarea stării multiple de steady state, de oscilațiile prelungite.

Cartea de față își propune să discute organizarea temporală și spațială a reacției BZ. Astfel, în capitolul I autorul face o introducere în cinetica chimică și în calculul diferențial ordinar și parțial. Apoi se descrie în detaliu reacția BZ, pentru ca în capitolul III să se analizeze amănunțit trei ecuații diferențiale propuse de Field și Noyes ca model al mecanismului Field-Körös — Noyes. Capitolul IV prezintă cîteva teorii asupra propagării uni-, bi- și tridimensionale a undelor chimice.

Se poate constata așadar că volumul, deși se adrezează unui număr restrîns de specialiști, este o contribuție valoroasă în domeniul atît de modern al biomatematicii.

C. Mușolan

Fortschritte der experimentellen und theoretischen Biophysik (Progrese ale biofizicii explerimentale și teoretice); editor W. Beier; caietul nr. 8; Dieter Noack, *Biophysikalische Prinzipien der Populationsdynamik in der Mikrobiologie* (Principii biofizice ale dinamicii populațiilor fn microbiologie), VEB Georg Theime, Leipzig, 1968, 100 p., 23 fig.

Autorul prezintă în această carte o aplicare la microbiologie a teoriei dinamicii populațiilor, din punctul de vedere al definiției lui Beier, după care populațiile sînt dependente de timp și spațiu, iar cauzele modificărilor pot fi cercetate din punct de vedere biofizic. Această definiție nu implică și structura socială a populațiilor, ceea ce corespunde cazului particular al microorganismelor.

Bineînțeles, aplicarea dinamicii populațiilor la microbiologie presupune unele limitări și caracteristici specifice populațiilor microbiene, care — din punct de vedere biofizic — sînt cele mai simple sisteme biologice.

Astfel, pentru înțelegerea și descrierea proceselor de dinamică a populațiilor de microorganisme se elaborează întîi un principiu de ordonare, pe baza relațiilor de schimb între elementele populațiilor.

Astfel se descriu și se analizează din punct de vedere biofizic diverse aspecte ale dinamicii populațiilor microbiene, ca chemostatul, sursele de alimentare, efectele opuse de inhibare-stimulare, sau încetinire-accelerare a ratei de creștere.

Un capitol special tratează matematic relația directă între două specii dintr-o populație mixtă. Un caz paticular al relației dintre două specii este relația parazit-gazdă, care este detaliat analizată.

În sfîrșit, raportul dintre populație și mediul înconjurător este tratat ca factor hotărîtor pentru atingerea uneia sau mai multor stări staționare.

Din cele relatate, reiese interesul pe care îl are volumul pentru ecologi, microbiologi, biofizicieni, matematicieni.

C. Mușolan

EMIL MÜLLER, Wolfgang Leoffler, MYCOLOGY, *An outline for science and medical students* (Micologie, un rezumat pentru studenții în științe și medicină), traducere în limba engleză de Bryce Kendrick și Felix Bärlocher, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1976, 182 fig. 17 tabele.

Micologia, prin implicațiile ei teoretice și practic aplicative, capătă în zilele noastre o importanță din ce în ce mai mare. De aceea, orice carte care încearcă o concentrare și sistematizare a informației din domeniul fungilor este binevenită.

Volumul de față este o prezentare a elementelor fundamentale ale micologiei și a aplicațiilor sale mai importante. Astfel, sînt expuse — într-un stil de mare conciziune — morfologia,

ultrastructura, metabolismul și genetica fungilor, Un capitol special se ocupă de clasificarea fungilor (myxomicotina, eumycotina, ascomicetele și basidiomicetele). Un alt capitol este consacrat micologiei aplicate, și anume aspectelor pozitive (fungii în prepararea alimentelor și furajelor, fungii ca producători de substanțe auxiliare în industria alimentară, fermentații fungice, fungii ca pesticide, etc), ca și celor negative (alterarea alimentelor, degradarea lemnelor, deteriorarea materialelor, fungii ca agenți patogeni pentru om, plante, animale).

Din acest conținut, cartea se dovedește foarte utilă pentru specialiști din diverse domenii, ca și studenților în științe naturale și medicină.

C. Mușolan

Pflanzendiagnose und Pflanzenanalyse zur Ermittlung von Ernährungsstörungen und des Ernährungszustandes der Kulturpflanzen (Diagnosticul și analiza plantelor, în scopul stabilirii tulburărilor și stării de nutriție a plantelor de cultură), Ed. W. Bergmann, P. Neubert, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1976, 711 p.

Cele două părți ale cărții cuprind : diagnosticul (2 scheme, 5 tabele rezumative, 12 tabele și 160 planșe colorate cu 519 ilustrații) și analiza plantelor (26 scheme, 11 tabele în text și 114 tabele corelative analizei plantelor).

Din cuprinsul primei părți spicuim : apariția, recunoașterea, caracterizarea și prevenirea simptomelor de vătămare a plantelor de cultură provocate de nutriția minerală, importanța factorilor de nutriție asupra creșterii plantelor, cauzele lipsei sau surplusului unor elemente nutritive, indicații de prevenire a lipsei sau excesului elementelor minerale. După o expunere generală asupra nutriției minerale și rezistenței plantelor, sînt prezentate date asupra fiziologiei elementelor minerale și a simptomelor determinate de lipsa sau excesul unor macro sau microelete. Tot aici, este expus și rolul unor elemente mai puțin investigate sub acest aspect : Na, Co, V, Si, Al. Un spațiu larg este acordat determinării simptomelor plantelor agricole față de lipsa unor elemente nutritive. Bibliografia acestei părți (expusă în aproximativ 14 pag.) și numărul mare de planșe colorate cuprinzînd specii din cele mai variate, ajută cititorului — biolog sau agronom — în detectarea rapidă a deficiențelor nutritive ale plantelor investigate.

Cea de a doua parte a cărții relevă bazele analizei plantelor și factorii care influențează, conținutul de substanțe nutritive al acestora. Un spațiu larg este afectat utilizării analizei materialului vegetal, prelucrării probelor pentru analiza chimică și domeniilor de utilizare practică a analizei plantelor. Sînt prezentate aici tabele de analiză a unui număr mare de specii, cereale plante uleioase, leguminoase, leguminoase furajere, legume, fructe, vița de vie etc. Cele 28 pag. ale indicațiilor bibliografice aferente acestei părți constituie o literatură adițională valoroasă.

Prin datele experimentale prezentate, prin volumul mare de informație conținut, cartea de față este deosebit de utilă practicienilor și cercetătorilor pentru recunoașterea și prevenirea tulburărilor de nutriție latente sau acute ale plantelor.

Lucia Doina Popov

B. MALMGREN, *Einführung in die Mikrobiologie* (Introducere în microbiologie), UTB, Schattauer Verlag Stuttgart-New York, 1976, 220 p., 61 fig., 8 tabele

Acest volum este ediția în limba germană a originalului *Introduktion till mikrobiologin*, a profesorului suedez Berndt Malmgren, de la Karolinska Institut din Suedia.

Cartea se adresează nespecialiștilor, avînd un pronunțat caracter de popularizare. Ea prezintă pe scurt un istoric al microbiologiei, metodele de cercetare, principalele realizări și problemele actuale ale acestei științe.

Capitolele speciale tratează clasificarea și morfologia protistelor, creșterea, chimia și fiziologia, influența factorilor externi asupra dezvoltării bacteriilor. Sînt deasemeni abordate probleme de genetică, ecologie, patogenicitate și virulență, imunologie.

Cartea este bogat ilustrată cu fotografii și scheme originale ceea ce mărește gradul de interes cu care este citită.

Constanța Mușolan

Membrane Antigens (Antigene de membrană), autor Alena Lengerova, ed. VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1977, 171 pg., 45 fig., 5 tab.

În această carte autoarea își propune să discute o serie de probleme legate de antigenele localizate pe suprafața membranei celulare, probleme sistematizate în 9 capitole.

În primul capitol, intitulat *Varietatea componentelor membranei celulare decelabile ca antigene*, sînt prezentate și discutate criteriile de clasificare ale antigenelor de suprafață precum și o serie de metode de evidențiere a lor.

Histocompatibilitatea și diferențierea antigenelor, subiectele capitolelor următoare, sînt abordate atît pe baza determinismului genetic al antigenității cît și pe baza caracteristicilor biochimice și biofizice ale diferitelor tipuri de celule.

O altă problemă atinsă în această lucrare este cea a modificărilor antigenelor membranelor celulelor tumorale. Sînt date o serie de concluzii, argumentate experimental, legate de tumorile induse chimic și viral a unor antigene normale localizate pe celulele tumorale precum și de schimbările unor receptori ai acestor celule.

După o prezentare a topografiei antigenelor de membrană, autoarea abordează o serie de probleme legate de natura dinamică a structurii membranei celulare și de reglare a expresiei componentelor membranei celulare.

Un ultim capitol al volumului discută implicarea antigenelor în fiziologia celulelor, fiind bogat ilustrat cu rezultate experimentale.

Prin valoarea și semnificația problemelor abordate precum și prin bogata bibliografie cuprinsă această carte este deosebit de utilă histochimiștilor, imunologilor și imunochimiștilor.

Ecaterina Ilica

Proceedings in Life Sciences: *Metabolic Interconversion of Enzymes*, 1975 (Interconversia metabolică a enzimelor, 1975), ed. S. Shaltiel, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New-York, 1976, 236 pag., 147 fig.

Acest volum cuprinde lucrările celui de al IV-lea Simpozion internațional consacrat *Interconversiei metabolice a enzimelor*, organizat la Arad (Israel), în perioada 27 Aprilie—2 Mai 1975, simpozion care se întrunește anual.

Cele mai multe lucrări sînt grupate în capitole ce tratează sistemele enzimatice interconvertibile clasice, ca de exemplu: glicogen-fosforilaza, glicogen-sintetaza, glutamin-sintetaza, piruvat-dehidrogenaza, etc., lucrări care abordează atît structura, modul de asamblare și interconversia metabolică cît și a mecanismelor de reglare și control ale acestor sisteme enzimatice.

Dintre celelalte capitole cu tematică generală, amintim: adenilarea, rolul fosforilării în metabolismul glutaminei, evaluarea proteolizei specifice ca mecanism reglator, studii enzimatice efectuate în condiții „in situ" și „in vivo".

Detaliile experimentale, ilustrarea grafică, includerea unui rezumat ce însoțește fiecare lucrare, ca și bibliografia aferentă fiecărui articol ușurează mult consultarea acestui volum.

Deasemenea, prin competența celor 61 de participanți, prin problematica abordată și prin soluțiile propuse, acest simpozion devine un punct de referință pentru toți cei interesați în acest domeniu, atît de intens cercetat azi.

Maria Andraș

LOTHAR WINKLER, *Klinische Biochemie* (Biochimie clinică), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1977, vol. 1 și 2, 571 pag., 119 fig., 45 tab.

Biochimia clinică este un manual pentru școlile tehnice cu profil medical, care datorită bunei primiri de care s-a bucurat este la a treia sa reeditare.

Cartea tratează, după o scurtă introducere, metabolismele intermediare pe parcursul a 10 capitole și anume: *Considerații generale*; *Enzime*; *Oxidarea biologică*; *Ciclul acidului citric*; *Bioxidul de carbon ca metabolit*; *Glucide*; *Lipide*; *Proteine*; *Acizi nucleici și Apa de constituție și electroliții-metaboliți minerali*, capitole revăzute și îmbunătățite față de ediția ante-

rioare. Partea a doua a manualului, intitulată biochimie funcțională, se ocupă de : *Singe* (în care s-au inclus și hemoproteinele), *Biochimia rinichiului* și *Hormoni*, renunțîndu-se la *Ficat* și *Digestie* care trebuie reunite și tratate dintr-un alt punct de vedere și care pot fi ușor studiate din alte manuale. În ultima parte, a metabolismelor „exterioare", se tratează problema bilanțului energetic și alimentației. Unele capitole sînt urmate de întrebări, sînt date cîteva indicații bibliografice, iar la sfîrșit se dă un index de subiecte.

Ținînd cont de sugestiile și criticile primite, autorul elaborează un curs complex, cu profil biochimic și pato-biochimic de un înalt nivel, util elevilor și absolvenților școlilor tehnice sanitare.

Zina Moldoveanu

H. BEGEMANN, *Praktische Hämatologie. Diferentialdiagnose, Therapie, Methodik* (Hematologie practică. Diagnoză diferențială, terapie, metodică), ediția a VI-a revizuită și lărgită, editura Georg Thieme, Stuttgart, 1977, 37 fig., 2 planșe colorate, 44 tabele, 494 pag.

Acest manual este rezultatul unei experiențe bogate și îndelungate în domeniul hematologiei clinice și se adresează medicilor practicieni și studenților de medicină și biochimie. Autorul a reușit să prezinte foarte sistematizat imensul material experimental și fundamental apărut în ultimii ani în acest domeniu, fără ca lucrarea să fie prea încărcată. Numeroasele scheme, tabele sinoptice, planșe colorate, forma concisă de prezentare a materialului fac din acest manual un îndrumător prețios, care pe lîngă aspectele practice de analiză și terapie dă și numeroase aspecte de relații patogenetice. O primă parte a materialului prezentat se referă la diagnoză, diagnoza diferențială și terapia bolilor de sînge. Partea centrală este consacrată terapiei generale a bolilor de sînge. O a treia și ultimă parte a cărții este dedicată metodicii folosite în hematologie. Un index alfabetic de autori (267 indicații bibliografice) și un index de subiecte completează în mod util și practic acest manual valoros apărut și în alte limbi.

Horst D. Schell

L. SACHS, *Statistische Methoden. Ein Soforthelfer für Interessierte in Naturwissenschaft, Medizin, Technik, Wirtschaft, Psychologie und Soziologie* (Metode statistice. Un ajutor imediat pentru cei interesați în domeniul științelor naturii, medicinei, tehnicii, economiei, psihologiei și sociologiei), ediția a III-a revizuită, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York, 1976, 5 fig., 25 tabele, 105 pag.

Acest volum cuprinde cele mai importante metode simple ale statisticei, care sînt însă satisfăcătoare pentru un număr de cazuri nebănuit de mare. După ce autorul prezintă în primul capitol succint și foarte sistematizat bazele și țelurile metodelor statistice, el tratează în continuare și pe capitole separate, aspectele legate de valorile medii și variabilitatea, distribuția frecvenței și distribuția frecvenței sumelor, distribuția normală, domeniul de siguranță, testele statistice, numărul minim de observații necesare, corelația și regresia. Ca anexă, autorul prezintă un procedeu rapid pentru comparare a mai multor valori medii. Limbajul explicit, sublinierile în text, numeroasele tabele și exemple concrete de aplicare sînt de un real folos atît pentru cei care aplică metodele statistice în prelucrarea datelor experimentale cît și pentru cei care doresc să se familiarizeze cu acest domeniu deosebit de actual și important.

Horst D. Schell

Gicht (Gută). *Tratat de medicină internă, vol. VII, partea a III-a, Boli metabolice*, ediția a V-a, editată de N. Zöllner și W. Gröbner, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1976, 205 fig. alb-negru sau color, 661 pag.

O serie de renumiți specialiști din Republica Federală a Germaniei, Statelor Unite ale Americii și Elveției tratează în volumul de față cu multă competență și profunzime multiplele aspecte ale gutei, care a devenit în ultimul deceniu una dintre cele mai importante boli metabolice. Multilateralitatea problemelor legată de această boală — care în majoritatea cazurilor

reprezintă manifestarea clinică a unei dereglări metabolice congenitale — se reflectă și în cele 29 de contribuții, dintre care 6 în limba engleză, grupate în 10 secțiuni. Aceste secțiuni tratează pe rînd următoarele aspecte : epidemiologie hiperuricemiei și guta, etiologia și patogeneza hiperuricemiei, patogeneza depunerilor de acid uric și a atacului de gută, anatomia patologică a gutei, clinica, diagnoza și diagnoza diferențială a gutei, terapia și profilaxia gutei, prognoza gutei, sindromul Lesch-Nyhan, xantinuria și orotic-aciduria ereditară. Iconografia bogată, vastul material bibliografic, condițiile grafice excelente fac din acest volum o sursă prețioasă de informare și instruire pentru interniștii din clinică precum și pentru reumatologi, urologi, hematologi, biochimiști și geneticieni cu preocupări în acest domeniu.

Horst D. Schell

IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to man. Some Carbamates Thicarbamates and Carbazides (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic al substanțelor chimice la om. Unii carbamați, tiocarbamați și carbazide) Vol. 12, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1976, 282 pp.

Volumul reprezintă punctele de vedere ale experților din grupul de lucru IARC, întruniți la Lyon, 9—15 iunie 1976.

Conform practicii acestui grup, în introducere se expun, printre altele, maniera de lucru și de întocmire a monografiilor grupului de experți, principiile generale de evaluare și o scurtă vedere de ansamblu asupra carbamaților, tiocarbamaților și carbazine — posibilități de apariție din natură, utilizări, metode generale de fabricație, motivele pentru care sînt considerate că ar prezenta un risc cancerogenic.

Aceste clase de substanțe pot fi întîlnite cu cele mai diverse utilizări.

Astfel, sînt trecute, de exemplu, în revistă, menționîndu-se la fiecare compus : sinonimele, formula chimică, proprietăți fizice și chimice, produși tehnici și impurități posibile, producere industrială, utilizare, apariție în natură și posibilități de detectare și analiză : *carbaryl* (insecticid), *chloropropham* (erbicid) *clorura de dimetilcarbamoil* (intermediar de sinteză în industria organică), *disulfiram* (accelerator de polimerizare), *dulcin* (înlocuitor al zahărului), *ferbam* (fungicid), *fenicarbazidă* (agent antipiretic și neuroleptic), *dietilditiocarbamat de sodiu* (reactiv analitic), etc. La fiecare substanță se dau numeroase referințe.

La sfîrșitul volumului există un index pentru toată seria.

Vl. Gheordunescu

Air Pollution and Cancer in Man (Poluarea aerului și cancerul la om) U. Mohr, D. Schmähl & L. Tomatis, eds., International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1977; 350 pag.

Volumul face parte dintre publicațiile științifice ale I.A.R.C. și cuprinde lucrările celui de-al II-lea Congres Internațional de la Hanovra, asupra carcinogenezei, 22—24 octombrie 1975.

În expunerea de motive a editorilor se arată că, deși produșii de ardere a țigaretelor reprezintă principalul agent etiologic pentru cancerul pulmonar, un rol important îl joacă poluarea aerului, în deosebi produșii de ardere ai motoarelor cu explozie, ai sistemelor de încălzire și ai industriilor de diferite tipuri.

Volumul cuprinde 4 secțiuni : rezultatele lucrărilor grupului de experți privind relația dintre poluarea aerului și cancerul pulmonar : rezultate practice, tratări matematice statistice, metodologii de lucru. Partea a 2-a — aspectele epidemiologice ale cancerului pulmonar la om — în Statele Unite, Italia, Scandinavia etc.; partea a 3-a — investigarea și înregistrarea substanțelor carcinogenice din aer — se referă la activități integrate ale unor organisme de specialitate. În ultima parte — semnificația pentru om a rezultatelor obținute pe animale — sînt privite critic posibilitățile de extrapolare ale datelor.

Volumul se înscrie printre preocupările extrem de actuale ale științei și profilaxiei igienico-sociale.

Vladimir Gheordunescu

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : PO Box1002, București 2, Romania.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V.D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

V. I. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

CRISTOFOR SIMIONESCU, VIORICA RUSAN şi VALENTIN POPA, **Chimia algelor marine**, 1974, 212 p., 18 lei.

D.A. ABRAHAM, **Mecanismul de acţiune al hormonilor steroizi**, 1975, 184 p., 13 lei.

EMIL POP ŞI RADU CODREANU, **Istoria ştiinţelor în România — Biologia**, 1975, 287 pl., 13,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 20, NR. 2, P. 121—240, BUCUREŞTI, IULIE—DECEMBRIE, 1977

I. P. Informaţia — c.7470

43 816

Lei. 20—